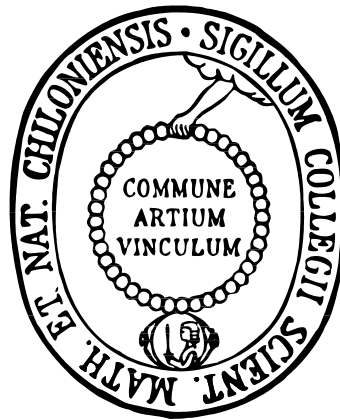


PULVERFORMULIERUNGEN FÜR DIE NASALE VAKZINIERUNG



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

VORGELEGT VON
SABRINA TROWS

KIEL 2012

Erster Gutachter:	Prof. Dr. H. Steckel
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. W. Blaschek
Tag der mündlichen Prüfung:	28.01.2013
Zum Druck genehmigt:	28.01.2013

gez. Prof. Dr. W. Duschl, Dekan

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Trows, S. und Westmeier, R. (2010). Development of a dry powder formulation for nasal vaccination. *7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*, Valletta, Malta.

Trows, S. und Scherließ, R. (2010). Development of a dry powder nasal vaccine formulation. *DPhG Jahrestagung*, Braunschweig.

Scherließ, R. und Trows, S. (2011). Novel formulation concept for particulate uptake of vaccines via the nasal associated lymphoid tissue. *Procedia in Vaccinology*, 4, 113-119.

Trows, S. und Scherließ, R. (2011). Development of a dry powder nasal vaccine formulation. *6th Polish-German Symposium*, Düsseldorf.

Scherließ, R. und Trows, S. (2011). Characterization of nasal deposition and post-nasal fraction of a model vaccine protein formulation. *Respiratory Drug Delivery Europe 2011*, 2, 321-325.

Trows, S. und Scherließ, R. (2012). Stability of antigen loaded dry powder microparticles for nasal vaccination. *8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*, Istanbul.

Trows, S. und Scherließ, R. (2012). Preparation and characterization of dry powder agarose nano-in-microparticles for nasal vaccination. *Respiratory Drug Delivery 2012*, 2, 491-496.

Trows, S. und Scherließ, R. (2012). Release from antigen-loaded nano-in-microparticles for nasal vaccination. *Drug Delivery to the Lungs 23*, Edinburgh.

Scherließ, R., Trows, S. und Buske, S. (2012). Overcoming challenges of inhaled vaccines through clever particle engineering. *Inhalation*. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Meinen Eltern gewidmet

*Man merkt nie, was schon getan wurde,
man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.*

Marie Curie

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1	Einleitung.....	1
1.2	Zielsetzung	3
2	Theoretischer Hintergrund.....	4
2.1	Anatomie und Physiologie der menschlichen Nase	4
2.1.1	Anatomie der Nase	4
2.1.2	Physiologische Funktionen.....	6
2.1.3	Aufbau und Funktion der Nasenschleimhaut	7
2.2	Impfen und Impfstoffe.....	9
2.2.1	Einleitung	9
2.2.2	Impfstrategien	10
2.2.3	Immunologische Grundlagen.....	15
2.3	Nasale Vakzinierung	22
2.3.1	Einleitung	22
2.3.2	Nasales Lymphoidgewebe.....	23
2.3.3	Anforderungen an eine optimale Formulierung	27
3	Material.....	33
3.1	Modellantigene	33
3.1.1	Bovines Serumalbumin	33
3.1.2	Ovalbumin	34
3.2	Polymere	35
3.2.1	Chitosan.....	35
3.2.2	Agarose.....	37
3.3	Trägermaterialien	38
3.3.1	Mannitol	38
3.3.2	Maltitol.....	39

3.3.3	Sorbitol	40
3.4	Applikationshilfen	40
3.4.1	PowderJet.....	41
3.4.2	Powder UDS.....	42
4	Methoden	44
4.1	Präparative Methoden	44
4.1.1	Sprühtrocknung.....	44
4.1.2	Mischungsprozess.....	46
4.2	Analytische Methoden.....	47
4.2.1	Partikelgrößenbestimmung	47
4.2.2	Gleichförmigkeit der abgegebenen Masse	52
4.2.3	Nasale Deposition	53
4.2.4	Bildgebende Verfahren.....	57
4.2.5	Proteinquantifizierung	59
4.2.6	Gelelektrophorese	62
4.2.7	Zirkulardichroismus-Spektroskopie	63
4.2.8	Freisetzungsuntersuchungen	66
4.3	Statistische Methoden	67
4.3.1	Deskriptive Statistik	67
4.3.2	Statistische Versuchsplanung.....	69
	Praktischer Teil	70
5	Mikropartikuläre Formulierungen	70
5.1	Einleitung.....	70
5.2	Chitosan-Mikropartikel	71
5.2.1	Herstellung durch Sprühtrocknung.....	71
5.2.2	Physikochemische Charakterisierung der Mikropartikel	74
5.2.3	Gleichförmigkeit der abgegebenen Masse	76
5.2.4	Nasale Deposition	78
5.2.5	Freisetzungsuntersuchungen	79
5.2.6	Proteinstabilität.....	82

5.2.7	Zusammenfassung.....	84
5.3	Interaktive Pulvermischungen	84
5.3.1	Herstellung der Pulvermischungen	86
5.3.2	Physikochemische Charakterisierung der Trägermaterialien und Pulvermischungen	87
5.3.3	Gleichförmigkeit der abgegebenen Masse	96
5.3.4	Nasale Deposition	98
5.4	Lagerstabilität.....	107
5.4.1	Durchführung	108
5.4.2	Tag 0	109
5.4.3	Vier Wochen.....	114
5.4.4	Sechs Monate	124
5.5	Zusammenfassung.....	133
6	Nanopartikuläre Formulierungen	136
6.1	Einleitung.....	136
6.2	Herstellung der Nanosuspension	139
6.3	Charakterisierung der Nanosuspension	140
6.4	Herstellung der nanopartikulären Formulierungen.....	142
6.4.1	Sprühtrocknung.....	143
6.4.2	Coating.....	144
6.5	Charakterisierung der sprühgetrockneten Formulierung.	146
6.5.1	Physikochemische Charakterisierung	146
6.5.2	Gleichförmigkeit der abgegebenen Masse	148
6.5.3	Nasale Deposition	149
6.5.4	Freisetzungsuntersuchungen	151
6.5.5	Proteinstabilität.....	153
6.6	Charakterisierung der durch Coating hergestellten Formulierung.....	156
6.6.1	Physikochemische Eigenschaften	156
6.6.2	Gleichförmigkeit der abgegebenen Masse	160
6.6.3	Nasale Deposition	160
6.6.4	Proteinstabilität.....	163

6.7	Zusammenfassung	164
7	Zusammenfassung der Arbeit	166
8	Abstract.....	169
9	Anhang	172
9.1	Verwendete Abkürzungen und Symbole	172
10	Literaturverzeichnis.....	174

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

„Impfungen gehören zu den wichtigsten und wirksamsten präventiven Maßnahmen, die in der Medizin zur Verfügung stehen“ (Robert Koch Institut, 2012). So konnte durch die Entwicklung von Impfstoffen und die konsequente Durchführung von Impfprogrammen die Ausbreitung einiger Infektionskrankheiten wie Poliomyelitis und Masern bereits eingedämmt und die Pockenerkrankung weltweit eliminiert werden.

Impfstoffe werden heutzutage überwiegend parenteral verabreicht, wodurch die möglichen Darreichungsformen auf sterile, flüssige Zubereitungen, wie Lösungen und Suspensionen, limitiert werden. Diese Impfstoffformulierungen sind einerseits sehr effektiv, andererseits weisen sie Defizite in der Stabilität auf (Brandau et al., 2003), so dass sie gekühlt gelagert und transportiert werden müssen. Die Bereitstellung einer Kühlkette ist nicht nur aufwendig, sondern vor allem kostenintensiv. Die parenterale Applikation von Impfstoffen kann außerdem nur durch medizinisches Fachpersonal durchgeführt werden, was die Immunisierung großer Bevölkerungsgruppen, besonders in Entwicklungsländern, erschwert und sie birgt immer die Gefahr einer Nadelstichverletzung beziehungsweise einer injektionsbegleitenden Infektion (Csaba et al., 2009; Partidos, 2000).

In den letzten Jahren wurden daher alternative Applikationswege für Impfstoffe, wie die mukosale Applikation, evaluiert, die auch die Verwendung von stabileren und leichter zu handhabbaren Pulverformulierungen ermöglicht. Neben der oralen Applikation, die bereits für die Polio-Impfung genutzt wurde, ist besonders die Immunisierung über die Schleimhäute des Respirationstrakts vielversprechend. Da die

mukosalen Gewebe häufig die erste Kontaktfläche für Krankheitserreger, wie Viren und Bakterien, mit dem Körper darstellen, sind sie reich an Lymphoidgewebe und Immunzellen, um eine frühzeitige Erregerabwehr gewährleisten zu können. Antigene können aktiv über spezialisierte Epithelzellen aufgenommen und direkt an antigenpräsentierende Zellen weitergegeben werden. Aufgrund der lokalen Prozessierung von Antigenen kann bei einer Impfung über die Schleimhaut, anders als bei der parenteralen Impfung, nicht nur eine systemische, sondern auch eine lokale Immunantwort induziert werden. Dies führt zur Sezernierung spezialisierter Antikörper, die Erreger in dem Moment, in dem sie in den Körper eindringen, erkennen und neutralisieren können. Darüber hinaus erfordert die mukosale Immunisierung keine Injektion, da die Applikation des Impfstoffs beispielsweise mit Hilfe eines Nasensprays oder Pulverinhalats erfolgen kann (Davis, 2001).

Aus technologischer Sicht sind bei der Entwicklung von mukosalen Impfstoffformulierungen verschiedene Aspekte zu berücksichtigen. So sollte das Antigen in der Formulierung möglichst in partikulärer Form vorliegen, da die Aufnahme von Partikeln zu einer verstärkten lokalen Immunantwort führt. Der Antigenträger sollte dabei in Größe und Oberflächeneigenschaften einem Bakterium oder Virus ähneln. Dieses kann beispielsweise über die Einbettung des Antigens in Nano- oder Mikropartikel realisiert werden. Außerdem sollte die Formulierung eine verlängerte Verweilzeit des Antigens auf der Mukosa sowie eine erhöhte Stabilität während der Lagerung gewährleisten (Slütter et al., 2008; Sharma et al., 2008). Ferner müssen die entwickelten Trägersysteme in eine anwendbare Arzneiform überführt werden, welche mit einer geeigneten Applikationshilfe vom Patienten angewendet werden kann und die sicherstellt, dass das Antigen auch seinen Bestimmungsort, das heißt die

pulmonale oder nasale Mukosa, erreicht. Diesen Ansprüchen werden vor allem Pulverformulierungen gerecht.

1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung von partikulären Impfstoffformulierungen, welche im trockenen Zustand mit einer geeigneten Applikationshilfe nasal appliziert werden können. Durch nasale Trockenpulvervakzine können die Stabilitätsprobleme einer flüssigen Impfstoffformulierung umgangen und die Applikation eines Antigens vereinfacht werden.

Der Fokus liegt dabei auf der Entwicklung von antigenbeladenen Nano- und Mikropartikeln, die aus biokompatiblen, mukoadhäsiven Polymeren hergestellt werden und ein Modellantigen enthalten sollen. Die Antigenträger sollen außerdem in finale Pulverformulierungen überführt werden, die für die nasale Anwendung geeignet sind. Die Charakterisierung soll neben der Messung der Partikelgröße und Beurteilung der Morphologie und des Freisetzungsverhaltens auch die Bestimmung der nasalen Deposition und der Dispergierbarkeit mit verschiedenen Applikationshilfen umfassen. Für die Bestimmung der Depositionsprofile soll ein künstliches Nasenmodell verwendet werden, welches auf einem CT-Scan einer menschlichen Nase beruht und Aussagen über die quantitative Verteilung der Formulierung in unterschiedlichen Bereichen der Nase zulässt. Zusätzlich soll der Einfluss der Herstellungsprozesse auf die Stabilität der Modellantigene sowie der Einfluss von Temperatur und Luftfeuchte auf die Lagerstabilität dieser Proteine beurteilt werden.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Anatomie und Physiologie der menschlichen Nase

2.1.1 Anatomie der Nase

Die Nasenkavität bildet den ersten Abschnitt des Respirationstrakts und dient der Vorbereitung der Atemluft bevor diese in die Lunge gelangt (Frick et al., 1992).

Der von außen sichtbare Teil der Nase umfasst die Nasenlöcher und etwa ein Drittel der Nasenkavität, welche beim Erwachsenen im Ganzen etwa 5 cm hoch und 10 cm lang ist (Mygind und Dahl, 1998). Eine schematische Darstellung der Nasenkavität ist in Abbildung 2.1 abgebildet. Die Nasenkavität wird durch die beiden Nasenhöhlen (Cavitates nasi) gebildet, die durch die teils knöcherne, teils knorpelige Nasenscheidewand (Septum nasi) voneinander getrennt sind (Faller, 1995). Die Oberfläche der beiden Nasenhöhlen beläuft sich etwa 150 cm² und das Volumen beträgt circa 15 ml (Morita und Yamahara, 2007). Nach unten hin ist die Nasenkavität durch den harten und weichen Gaumen begrenzt. Direkt hinter dem Naseneingang, der durch lange, reusenartige Haare (Vibrissae) versperrt ist, liegt der Nasenvorhof (Vestibulum nasi) (Thews et al., 1999). Der Nasenvorhof stellt den engsten Bereich der Nase dar und bedingt zu ungefähr 50% den Widerstand der Respirationsluft von den Nasenlöchern bis zu den Alveolen (Mygind und Dahl, 1998). Hinter dem Nasenvorhof befinden sich die Nasenmuscheln (Conchae nasales), die in die unteren (Concha nasalis superior), mittleren (Concha nasalis media) und oberen Nasenmuscheln (Concha nasalis inferior) gegliedert werden. Diese mit Schleimhaut bedeckten Knochenspannen ragen aus der Seitenwand in das Innere der Nasenhöhle und gliedern diese in je drei Nasengänge (Meatus nasi). Die Nasenmuscheln dienen der Oberflächenvergrößerung der

Nasenhöhle und verhindern aufgrund ihrer strömungstechnisch günstigen Anordnung eine Verwirbelung der Atemluft in diesem Bereich (Thews et al., 1999).

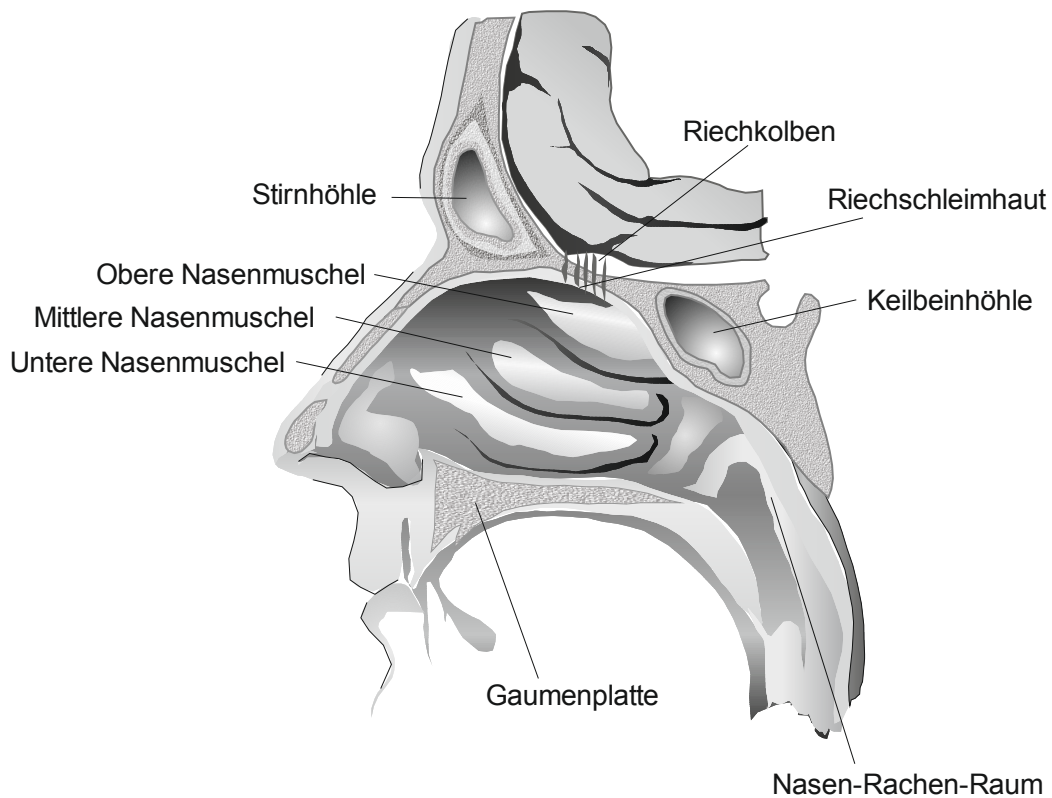


Abbildung 2.1: Längsschnitt durch die Nase, modifiziert nach Boenninghaus (1977)

Durch Öffnungen in den mittleren und oberen Nasengängen ist die Nasenhöhle mit den Nasennebenhöhlen (Sinus paranasales) verbunden. Diese werden in die Kieferhöhle (Sinus maxillaris), die Stirnhöhle (Sinus frontalis), das Siebbeinlabyrinth (Sinus ethmoidales) und die Keilbeinhöhle (Sinus sphenoidales) unterteilt (Thews et al., 1999).

Die beiden Nasenhöhlen münden hinter dem Bereich der Nasenmuscheln in den Nasen-Rachen-Raum (Nasopharynx). Den Übergang bilden dabei die inneren Nasenlöcher (Choanen).

2.1.2 Physiologische Funktionen

Die Nase zeigt vielfältige physiologische Funktionen, zu denen unter anderem der Geruchssinn (Olfaktion) und die Filtration, Befeuchtung und das Anwärmen der Respirationsluft gehören.

Der Geruchssinn ist der komplexeste und empfindlichste der chemischen Sinne und dient der Informationsgewinnung über Geruchsstoffe in der Umwelt. Die Wahrnehmung von Gerüchen erfolgt dabei im Bereich der Riechschleimhaut (Regio olfaktorica), die in den oberen Nasenmuscheln lokalisiert ist. Der Geruchssinn ist zusammen mit dem Geschmackssinn an der reflektorischen Auslösung der Speichel- und Magensaftproduktion beteiligt und beeinflusst unter anderem auch emotionale Verhaltensweisen (Thews et al., 1999).

Die Filtration, Befeuchtung und das Anwärmen von inhalierter Luft dient dem Schutz der Atemwege. Bei behinderter Nasenatmung kommt es häufig zu chronisch entzündlichen Erkrankungen der Schleimhäute im Bereich des Rachens, des Kehlkopfes und der unteren Atemwege (Thews et al., 1999). Hauptverantwortlich für die Filtration der Respirationsluft beziehungsweise Abscheidung von Partikeln in der Nase sind die Vibrissae und der Nasenvorhof (Geurkink, 1983). Die Effektivität der Filtrationsleistung ist dabei primär abhängig von der Größe der inhalierten Partikel. Die Abhängigkeit der Deposition von der Partikelgröße wurde von Garmise et al. (2009) zusammengefasst: Partikel $> 50 \mu\text{m}$ werden annähernd vollständig, Partikel $> 12,5 \mu\text{m}$ zu 80% in der Nase abgeschieden. Außerdem können 50% der Partikel zwischen $2\text{-}4 \mu\text{m}$ die Nase passieren und in die Lunge gelangen. Die Deposition der Partikel in der Nasenhöhle beruht dabei überwiegend auf Impaktion.

Neben der Filtration wird die Einatemluft in der Nase auf etwa 31°C erwärmt, was durch ein feines Venengeflecht in den unteren Nasenmuscheln begünstigt wird und ist bei Verlassen des Pharynx nahezu

mit Wasser gesättigt (Mygind und Änggård, 1984). Die Temperatur in der Nasenhöhle schwankt auch bei veränderten Umgebungstemperaturen nur um 1-2°C. Während der Einatmung beträgt die Temperatur in den mittleren Nasenschleimhäuten etwa 32°C, während der Expiration circa 35°C (Keck et al., 2000).

2.1.3 Aufbau und Funktion der Nasenschleimhaut

Die Nasenschleimhaut wird in zwei Abschnitte unterteilt: die Regio olfactoria (Rieschschleimhaut) und die Regio respiratoria (respiratorische Schleimhaut). Die Rieschschleimhaut befindet sich an der oberen Nasenschleimhaut und besteht aus Rieschzellen, Stützzellen und Basalzellen (Thews et al., 1999). Die Aufgabe des Rieschepithels besteht in der Wahrnehmung von Geruchsreizen. Der überwiegende Anteil der Nasenhöhle ist allerdings mit respiratorischem Epithel ausgekleidet. Dieses besteht aus Zylinderepithelzellen, die überwiegend Kinozilien (Flimmerhaare) aufweisen, Becherzellen und Basalzellen (Monteiro-Riviere und Popp, 1984) und ist mit Nasalflüssigkeit überschichtet. Die Nasalflüssigkeit ist dabei in zwei Schichten unterteilt. Die untere Schicht (Solschicht) geht aus Exsudaten der Epithelzellen hervor und weist eine geringe Viskosität auf. Die obere Schicht (Gelschicht) ist dagegen deutlich viskoser und wird von den Becherzellen produziert (Marttin et al., 1998). Der Mukus besteht zu 95% aus Wasser und enthält außerdem noch Elektrolyte, Proteine, dazu gehören unter anderem Immunglobuline, Wachstumsfaktoren und Enzyme wie das Lysozym, und Lipide, wie zum Beispiel Phospholipide und Cholesterol (Bansil und Turner, 2006). Eine weitere wichtige Komponente des Mukus stellt das Mucin dar. Dieses Glykoprotein besteht aus einem Proteingrundgerüst mit alternierend angeordneten glykosilierten und nicht-glykosilierten Bereichen, wobei die glykosilierten Bereiche 70-80% des Polymers ausmachen. Aufgrund der

endständigen Sulfat- und Sialinsäurereste verhält sich das Mucin im Bereich des neutralen pH-Werts polyanionisch (Verdugo, 1991). Außerdem trägt die Quartärstruktur des Mucins, welche sowohl linear als auch verzweigt sein kann, maßgeblich zu den viskoelastischen Eigenschaften des Mukus bei (Bansil und Turner, 2006). Die Nasalflüssigkeit übernimmt, neben einigen anderen Aufgaben, wichtige Barrierefunktionen in der Nase. Wanner et al. (1996) haben die Funktionen des mukoziliären Systems des Respirationstrakts zusammengefasst: (I) der Mukus bildet eine mechanische Barriere, da Partikel aus dem Luftstrom eingefangen und durch aktive Zilientätigkeit aus dem Respirationstrakt entfernt werden (mukoziliäre Clearance), (II) die Oberflächenfluide schirmen die Epithelien gegenüber chemischen Einflüssen ab, denn der Mukus weist unter anderem antioxidative Eigenschaften auf, (III) der Mukus stellt auch eine biologische Barriere dar, da er mit Mikroorganismen interagieren und dadurch eine Migration dieser durch das Epithel verhindern kann.

Die mukoziliäre Clearance wird durch die aktive Bewegung der Zilien der Epithelzellen verursacht und der Zilienschlag wird dabei in zwei Phasen unterteilt. In der effektiven Phase durchdringen die Zilien die Gelschicht der Nasalflüssigkeit und der Schlag schiebt den Mukus in Richtung Nasopharynx, wo er verschluckt wird. In der Erholungsphase gleiten die Zilien durch die weniger viskose Solschicht in ihre Ausgangsstellung zurück (Garmise, 2009). Die Geschwindigkeit des normalen mukoziliären Transports beträgt im vorderen Bereich der Nase 1-2 mm/min und im hinteren Bereich 8-10 mm/min (Jones, 2001), somit wird die Mukusschicht circa alle 15 min erneuert. Die Zilientätigkeit und damit die mukoziliäre Clearance zeigt zum Teil große interindividuelle Unterschiede, die nicht zuletzt auch auf pathologische Veränderungen zum Beispiel der Nasalmukosa zurückzuführen sind.

2.2 Impfen und Impfstoffe

2.2.1 Einleitung

Die Erfolgsgeschichte der aktiven Immunisierung begann bereits vor Jahrhunderten, als versucht wurde, gesunde Menschen mit schwachen Krankheitserregern in Kontakt zu bringen, um sie vor Ansteckung im Fall einer auftretenden Epidemie zu schützen. Diese prophylaktischen Maßnahmen, meistens gegen verheerend verlaufende Pockenepidemien, wurden bereits im Römischen Reich, in der mittelalterlichen chinesischen Sung-Dynastie und im frühneuzeitlichen Indien durchgeführt (Helmstädter, 2008). Dabei wurde den gesunden Menschen infektiöses Material, zum Beispiel der Inhalt von Pusteln oder getrocknete Pockenkrusten eines an Pocken erkrankten Patienten, unter anderem über die Nase oder Einritzungen der Haut verabreicht. Diese Frühform der aktiven Immunisierung wird Inokulation oder Variolation genannt. Im 18. Jahrhundert breitete sich das Verfahren der Inokulation über Konstantinopel nach Europa aus und fand besonders in England großen Anklang. Lady Mary Wortley Montague, die Frau des britischen Gesandten in Konstantinopel, ließ 1717 ihre fünfjährige Tochter inokulieren und der Erfolg des Verfahrens erregte Interesse bei den Leibärzten des britischen Königshauses (Helmstädter, 2008). Diese übernahmen nach und nach diese türkische Methode der Inokulation und das Verfahren gelangte schließlich von England aus nach Deutschland und Nordamerika. Trotz der vielen Erfolge kam es auch immer wieder zu Todesfällen, da die Inokulation allein empirisch, ohne das Wissen um Krankheitserreger und immunologische Mechanismen, entstanden war. Die Weiterentwicklung und Einführung der Vakzinierung ist schließlich auf den englischen Landarzt Edward Jenner zurückzuführen, der Ende des 18. Jahrhunderts eine Reihe bahnbrechender Experimente durchführte (Riedel, 2005). Er infizierte Kinder und

Erwachsene mit Kuhpocken, eine für den Menschen meist harmlos verlaufende Krankheit und es zeigte sich, dass diese Personen wenige Wochen später immun gegen „echte“ Pocken waren. Mit der Entdeckung der ersten Krankheitserreger durch Louis Pasteur und Robert Koch Ende des 19. Jahrhunderts konnten dann gezielt Methoden zur Abschwächung von Erregern und damit weitere Impfstoffe entwickelt werden. Neben dem Pockenimpfstoff gab es zunächst Impfstoffe gegen Tuberkulose, Diphtherie und Tetanus und ab Mitte der 1950er Jahre gegen Poliomyelitis. Seit 1966 wurden dann zunehmend durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) weltweit Impfprogramme gegen Infektionskrankheiten entwickelt, die sehr erfolgreich sind. So konnte 1980 die Welt für pockenfrei erklärt werden (WHO, 2010). Auch bei der Eindämmung vieler anderer, teils drastisch verlaufender Infektionskrankheiten wie Poliomyelitis und Masern, konnten mittels Vakzinierung beeindruckende Erfolge verzeichnet werden (Meyer et al., 2002).

2.2.2 Impfstrategien

Die Impfung ist in der Regel eine vorbeugende Maßnahme zum Schutz gegen virale oder bakterielle Infektionskrankheiten. Grundsätzlich unterscheidet man beim prophylaktischen Impfen zwischen der aktiven und der passiven Immunisierung. Bei der aktiven Immunisierung werden Antigene appliziert, die durch Stimulation des Immunsystems zur Bildung spezifischer Antikörper und T-Zellen führen, welche Immunität gegen die entsprechende Infektionskrankheit bewirken. Als Antigene dienen unter anderem abgeschwächte und abgetötete Erreger oder auch Fragmente dieser (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Die Immunität kann dabei jahre- bis lebenslang andauern. Bei der passiven Immunisierung werden Immunglobuline, das heißt spezifische Antikörper, verabreicht, die kurzfristig einer Infektionskrankheit vorbeugen. Da die Antikörper

allerdings innerhalb weniger Wochen abgebaut werden, ist die Immunität nur von kurzer Dauer. Daher eignet sich die passive Immunisierung nur als Notfallmaßnahme (Vollmar und Dingermann, 2005).

Von der prophylaktischen Impfung abzugrenzen ist die therapeutische Impfung. In der Regel werden in diesem Fall, wie bei der passiven Impfung, spezifische Immunglobuline appliziert, die allerdings der Therapie einer bereits bestehenden Erkrankung dienen. Therapeutische Impfstoffe werden zum Beispiel im Rahmen der Krebstherapie eingesetzt (Curigliano et al., 2007; Gross et al., 2009).

2.2.2.1 Impfstoffklassen

Die zurzeit auf dem Markt verfügbaren Impfstoffe werden in drei verschiedene Kategorien unterteilt: Lebendvakzine (lebende, attenuierte Erreger), Vakzine aus inaktivierten Erregern und Subunit-Vakzine. Außerdem wird jeweils zwischen viralen und bakteriellen Impfstoffen unterschieden. In Tabelle 2.1 sind Beispiele für die verschiedenen Impfstoffklassen zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Beispiele für verschiedene Impfstoffklassen nach Vollmar et al. (2005)

Kategorie	Beispiel
Lebendvakzine	
viral	Polio-Virus Masern-Virus Mumps-Virus Röteln-Virus
bakteriell	<i>Salmonella typhi</i>
Inaktivierte Erreger	
viral	Polio-Virus Tollwut-Virus FSME-Virus
bakteriell	<i>Vibrio cholerae</i>
Subunit-Vakzine	
viral	Influenza-Virus Hepatitis-B-Virus
bakteriell	<i>Bordetella pertussis</i> <i>Salmonella typhi</i>
Toxoide	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Clostridium tetani</i>

Die Herstellung eines attenuierten Virusstammes erfolgt meist in der Zellkultur durch Selektion von Viren, die sich bevorzugt in nichtmenschlichen Zellen vermehren. Die Viren stammen ursprünglich aus menschlichen Zellen und werden dann häufig in Affenzellen kultiviert. Dabei verlieren sie aufgrund von Mutationen ihre Fähigkeit sich in menschlichen Zellen zu vermehren. Dies führt dazu, dass die Viren nicht mehr pathogen sind, aber nach Applikation des Impfstoffs dennoch zur Immunität führen. Wenn das für die Virulenz verantwortliche Gen bekannt ist, kann es auch gentechnisch verändert oder ganz aus dem Genom

entfernt werden, um einen avirulenten Stamm herzustellen. Dadurch lässt sich eine Attenuierung schneller und verlässlicher erreichen. Die Attenuierung von Bakterienstämmen erfolgt hauptsächlich durch die Anwendung gentechnischer Methoden und der Selektion nichtpathogener Mutanten (Janeway et al., 2002).

Die Inaktivierung, das heißt, das Abtöten von Viren oder Bakterien erfolgt häufig durch Hitzebehandlung oder mittels Chemikalien (zum Beispiel Formaldehyd oder Phenol). Da inaktivierte Erreger sich nicht mehr vermehren können, ist bei diesen, im Gegensatz zu Lebendimpfstoffen, ausgeschlossen, dass sie im menschlichen Körper zu einem virulenten Stamm revertieren und es zu einer Infektion kommt. Allerdings induzieren Lebendimpfstoffe aufgrund des Vorhandenseins vermehrungsfähiger Erreger und der daraus resultierenden lang anhaltenden Impfdosis die beste und zuverlässigste Immunantwort, die oft ein Leben lang anhält (Vollmar und Dinger, 2005).

Subunit-Vakzine enthalten spezifische Oberflächenantigene von Bakterien oder Viren, wie zum Beispiel Kapsel-Polysaccharide, die antigene Eigenschaften haben und zur Immunität führen. Außerdem können auch die von einigen Bakterien produzierten Toxine in einer abgeschwächten Form eingesetzt werden (Toxoid-Impfstoffe). Im Gegensatz zu Ganzkeim-Vakzinen zeigen Subunit-Impfstoffe weniger Nebenwirkungen, allerdings sind sie auch weniger immunogen. Um die Immunogenität zu erhöhen werden in Subunit-Impfstoffen daher häufig Adjuvantien eingesetzt (Vollmar und Dinger, 2005).

2.2.2.2 Adjuvantien

Adjuvantien werden dem Impfstoff zugesetzt, um die Immunogenität des Antigens zu erhöhen und die Effektivität der Immunantwort zu erhöhen (Autenrieth und Noll, 1998). Zu den am häufigsten verwendeten Adjuvantien gehören Aluminiumverbindungen (Aluminiumhydroxid und -phosphat), da sie gut verträglich sind, wenig kosten und außerdem die Immunogenität einer Vielzahl von Antigenen erhöhen können (Gupta, 1998). Bei der Herstellung des Impfstoffs kann das Antigen entweder zusammen mit den Aluminiumverbindungen präzipitiert oder, was häufiger erfolgt, an einem Gel aus Aluminiumhydroxid oder Aluminiumphosphat adsorbiert werden (Lindblad, 2004b). Der Wirkmechanismus dieser Verbindungen ist sehr komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein wichtiger Aspekt ist die durch die Bildung eines unlöslichen Komplexes verlängerte Verweilzeit des Antigens an der Injektionsstelle (Lindblad, 2004a).

Neben Aluminiumverbindungen können auch Lipopolysaccharide (LPS) oder daraus abgeleitete Verbindungen wie das Monophosphoryllipid A und Derivate der Saponine, wie zum Beispiel das aus der Rinde von *Quillaja saponaria* (Seifenrindenbaum) gewonnene QS-21 verwendet werden. Diese Adjuvantien fördern die Bildung der Zytokine Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN- γ), die wiederum die Bildung von T-Helferzellen begünstigen (Singh und O'Hagan, 2002).

Eine andere Gruppe von Adjuvantien bilden die Emulsionen. Hier ist vor allem das MF59 zu nennen, bei dem es sich um eine Öl-in-Wasser Emulsion handelt, die aus Squalen, Polysorbat 80 und Sorbitantrioleat (Span 85) besteht. MF59 unterstützt nicht nur eine T_H1 -vermittelte Immunantwort, sondern erhöht zudem die Aufnahme des Antigens durch antigenpräsentierende Zellen (Wilson-Welder et al., 2009). Eingesetzt wird

MF59 unter anderem in dem Influenzaimpfstoff FLUAD (Fachinformations Service, 2012a).

In der Literatur wird außerdem noch der Einsatz von partikulären Adjuvantien beschrieben. Dazu gehören unter anderem Mikro- und Nanopartikel, immunstimulierende Komplexe (Immunostimulating complexes, ISCOMs), Liposomen, Virosomen und Virus-ähnliche Partikel (virus-like particles). Die Hauptaufgabe der partikulären Adjuvantien ist die effektive und zielgerichtete Übergabe des Antigens an antigenpräsentierende Zellen (Singh und O'Hagan, 2002). Neben ihrer adjuvanten Wirkung werden diese speziellen Partikel auch als Trägersysteme für die Applikation von Impfstoffen, häufig auch für die mukosale Vakzinierung, eingesetzt. Diese partikulären Trägersysteme werden in Abschnitt 2.3.3.1 erläutert.

2.2.3 Immunologische Grundlagen

Das Immunsystem des Menschen kann in das angeborene und das adaptive (erworbene) Immunsystem unterteilt werden, welches jeweils aus zellulären und humoralen (löslichen) Komponenten besteht. Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören die Makrophagen, dendritische Zellen (DC), Granulozyten und natürliche Killerzellen. Makrophagen und DCs gehören zu den sogenannten antigenpräsentierenden Zellen (APC), zu deren Aufgaben unter anderem die Aufnahme von Krankheitserregern und die anschließende Antigenpräsentation gehören. Die zellulären Komponenten werden durch das Komplementsystem ergänzt, das die humorale Komponente bereitstellt. Das Komplementsystem ist ein enzymatisches Kaskadensystem, das aus über 20 Aktivator- und Regulationsproteinen besteht und dessen

Aktivierung in der Infektabwehr unter anderem zur Lyse des Pathogens führt (Vollmar und Dingermann, 2005; Zündorf et al., 2008).

Beim adaptiven Immunsystem stellen die B- und T-Zellen die zelluläre Komponente und Antikörper die lösliche Komponente dar. Die Vorteile des erworbenen Immunsystems liegen in der Antigenspezifität der Immunreaktion und der Bildung eines immunologischen Gedächtnisses. Die Aktivierung des adaptiven Immunsystems erfolgt durch die Präsentation von Antigenen durch APC mit Hilfe spezieller Oberflächenproteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes I und II (major histocompatibility complex, MHC). Die Erkennung des Antigens durch T- und B-Zellen erfolgt dann über spezielle T-Zell-Rezeptoren (TCR) beziehungsweise B-Zell-Rezeptoren (BCR). BCR sind in der Lage Antigene direkt zu binden, TCR benötigen dagegen immer ein MHC-Molekül als Träger. Bei Impfstoffen ist darauf zu achten, dass möglichst alle antigenen Determinanten (Epitope) des Pathogens enthalten sind, damit eine Aktivierung sowohl von T- als auch von B-Zellen stattfindet und hochaffine Antikörper gebildet werden können (Zündorf et al., 2008).

2.2.3.1 Prozessierung von Antigenen und Immunantwort

Die Prozessierung und Präsentation von Antigenen erfolgt auf zwei unterschiedlichen Wegen und ist abhängig von der Art des Antigens. Antigene von intrazellulären Erregern wie zum Beispiel Viren werden nach proteasomalen Abbau über MHC-I den zytotoxischen T-Zellen präsentiert. Antigene von phagozytierten Erregern werden dagegen auf APC über MHC-II den T-Helferzellen präsentiert. Die zytotoxischen T-Zellen sowie die T-Helferzellen gehören zu den Lymphozyten. Eine Unterscheidung von Lymphozytenpopulationen geschieht aufgrund unterschiedlicher Markerproteine, den sogenannten CD-Antigenen (cluster of differentiation antigens), die sich auf der Zelloberfläche der Lymphozyten befinden. Die

zytotoxischen T-Zellen sind $CD8^+$, die T-Helferzellen $CD4^+$ (Vollmar und Dingermann, 2005).

Der MHC-I und der MHC-II-Weg sind in Abbildung 2.2 und Abbildung 2.3 dargestellt. Einige Antigene, wie zum Beispiel virale Proteine, befinden sich im Zytoplasma von infizierten Zellen. Diese Antigene werden durch Ubiquitinylierung markiert und im Proteasom proteolytisch gespalten. Die entstandenen Peptidfragmente werden mittels eines Transporters (TAP, transporter associated with antigen processing) ins Endoplasmatische Retikulum (ER) geschleust. Im ER werden MHC-I-Moleküle synthetisiert, an die die Peptidfragmente binden. Über Transportvesikel wird der Komplex zur Zellmembran transportiert und $CD8^+$ -T-Zellen präsentiert. Der TCR der zytotoxischen T-Zellen bindet an das präsentierte Peptidfragment und die T-Zelle wird aktiviert. Sie sezerniert unter anderem Perforine und leitet die Apoptose der infizierten Zelle ein (Vollmar und Dingermann, 2005).

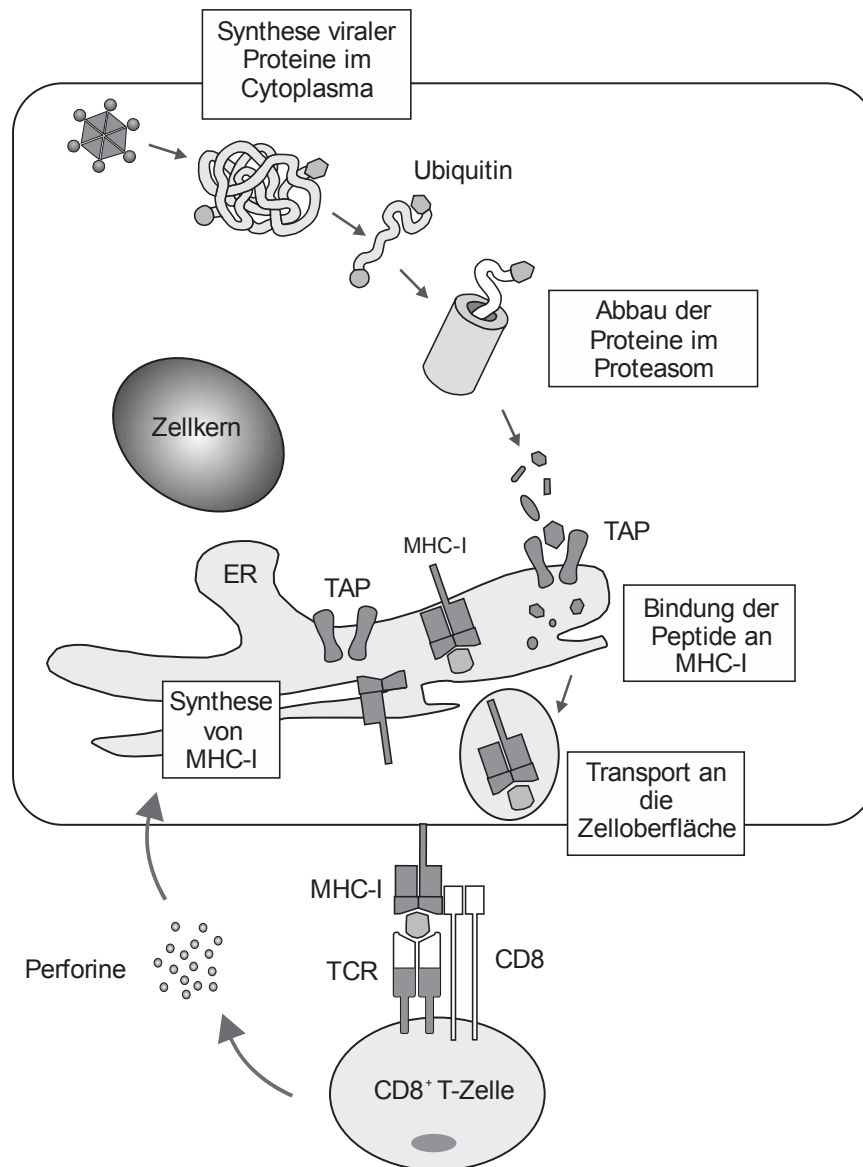


Abbildung 2.2: Prozessierung von Protein-Antigenen und Präsentation über MHC-I, Erklärung im Text; modifiziert nach Vollmar et al. (2005)

Extrazelluläre Erreger werden von APC mittels Endozytose aufgenommen und das entstandene Endosom fusioniert in der Zelle mit Lysosomen. In den resultierenden Endolysosomen wird das Antigen proteolytisch gespalten und es entstehen unterschiedliche Peptidfragmente. Im ER der APC werden MHC-II-Moleküle synthetisiert, deren Bindungsstellen mit CLIP (class-II invariant chain peptide) besetzt sind und in Transportvesikel verpackt.

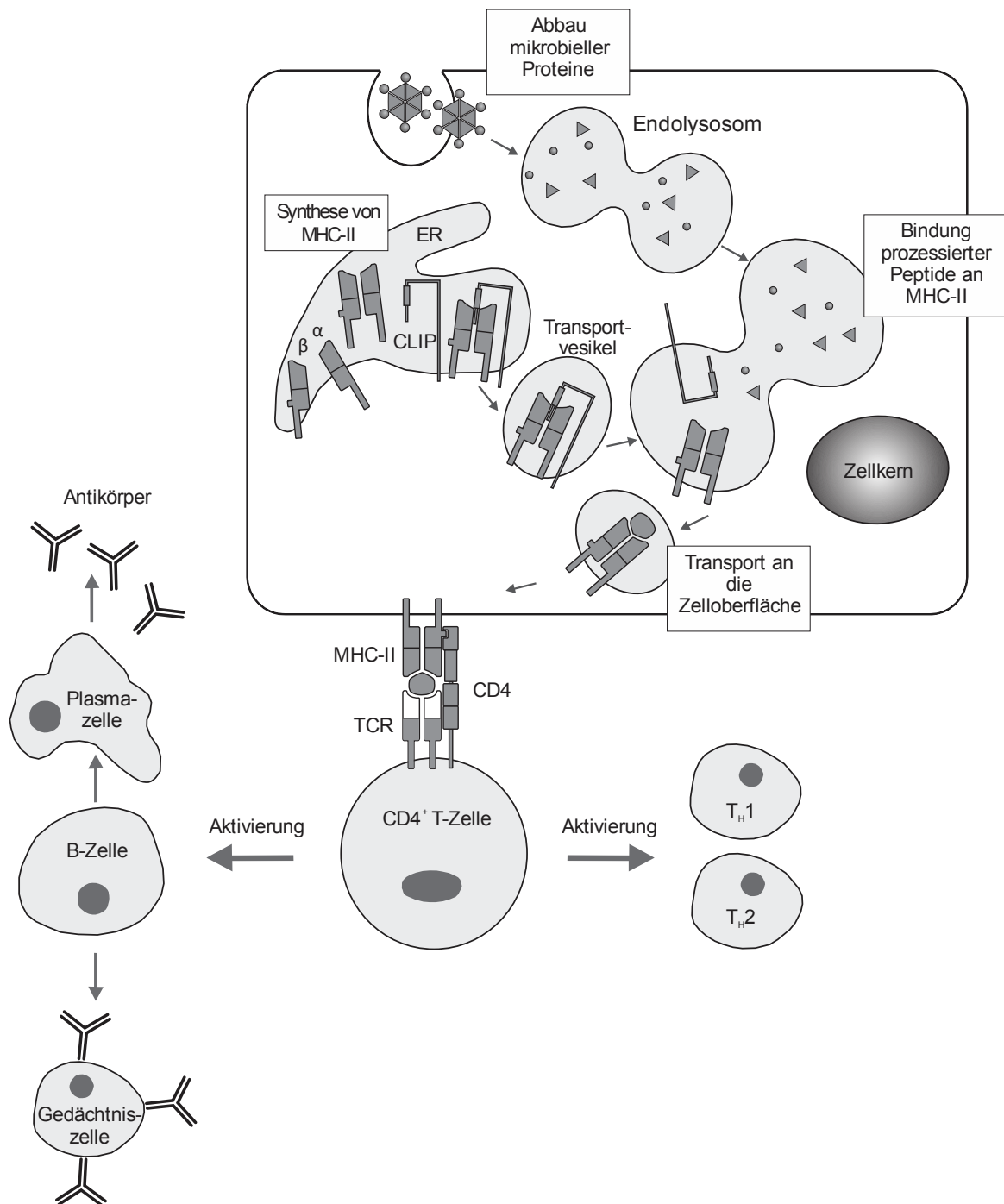


Abbildung 2.3: Prozessierung von Protein-Antigenen und Präsentation über MHC-II, Erklärung im Text; modifiziert nach Vollmar et al. (2005)

Diese Transportvesikel fusionieren mit Transportvesikeln, die die Peptidfragmente enthalten und CLIP wird entfernt, damit das Antigen an MHC-II-Moleküle binden kann. Der MHC-II-Komplex wird in die Zellmembran eingebaut und CD4⁺-T-Zellen präsentiert. Nach Binden des

TCR an das präsentierte Peptidfragment und Interaktion der T-Zelle mit der APC über CD80 und CD82 wird die T-Helferzelle aktiviert. Diese sezerniert daraufhin IL-2 und proliferiert. Die naiven CD4⁺-T-Zellen differenzieren zu T_H1- und T_H2-Effektorzellen aus, welche unterschiedliche Funktionen ausüben. Während die T_H1-Zellen hauptsächlich das Zytokin IFN- γ produzieren und für die Aktivierung von Makrophagen zuständig sind, aktivieren die T_H2-Zellen überwiegend IL-4 vermittelt B-Zellen. Aktivierte B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen aus und bilden Antikörper, die spezifisch für das präsentierte Antigen sind. Die gebildeten Antikörper binden an die antigenen Bereiche der Erreger oder Toxine und blockieren diese, so dass eine Infektion verhindert werden kann. Welcher Antikörper-Isotyp produziert wird, ist dabei abhängig von der Art des sezernierten Zytokins und dem Ort der Immunantwort. Das Immunglobulin A (IgA) ist zum Beispiel der Hauptisotyp der Schleimhäute (Vollmar und Dinger mann, 2005; Zündorf et al., 2008; Janeway et al., 2002).

B-Zellen sind, wie auch APC, in der Lage Antigene zu phagozytieren und über MHC-II zu präsentieren. Handelt es sich dabei um ein Peptidantigen, ist für die Produktion von Antikörpern eine Aktivierung durch T-Zellen notwendig. Stellt das aufgenommene Antigen aber zum Beispiel ein Polysaccharid oder Lipid dar, können auch ohne die Hilfe von T-Zellen Antikörper produziert werden. Allerdings sind die gebildeten Antikörper weniger spezifisch und es erfolgt keine Bildung von Gedächtniszellen. Dieses ist bei der Entwicklung von einigen Subunit-Vakzinen zu bedenken, da als Antigen häufig Oberflächenpolysaccharide verwendet werden. Um eine verbesserte Immunantwort hervorzurufen, werden deshalb häufig Konjugatimpfstoffe hergestellt, bei denen das Antigen an ein Protein gebunden ist, welches wiederum von T-Zellen erkannt wird (Vollmar und Dinger mann, 2005; Zündorf et al., 2008).

Bei der Aktivierung von T- und B-Zellen kommt es nicht nur zu einer Ausdifferenzierung der Zellen, sondern auch zur Bildung von Gedächtniszellen. Diese zirkulieren im Blut oder befinden sich im Knochenmark und können bei erneutem Antigenkontakt schnell wieder spezifische Antikörper bilden. Die Produktion von hochaffinen Antikörpern und die Bildung von Gedächtniszellen sind primäre Ziele der aktiven Immunisierung. So können Infektionen durch Pathogene zu einem frühen Zeitpunkt effektiv abgewehrt werden. Die meisten Impfstoffe induzieren eine Immunantwort über die MHC-II gesteuerte Antigenpräsentation und T-Zell vermittelte Produktion von Antikörpern. Allein virale Lebendvakzine können zusätzlich auch eine MHC-I-Antwort hervorrufen, da diese Antigene in der Lage sind, sich in Körperzellen zu vermehren. Im Allgemeinen unterscheiden sich die Immunantworten nach dem ersten und dem erneuten Antigenkontakt. Daher unterscheidet man auch zwischen der primären und sekundären Immunantwort. Nach dem ersten Antigenkontakt werden quantitativ weniger Antikörper mit einer geringeren Affinität gebildet als bei der Sekundärantwort. Die Sekundärantwort basiert auf der Aktivierung von Gedächtniszellen und führt zur Bildung hochspezifischer Antikörper-Isotypen, die in großen Mengen produziert werden. Um einen ausreichenden Schutz zu gewährleisten, werden Impfstoffe daher mehrmals in Abständen von einigen Wochen appliziert (Zündorf et al., 2008).

2.3 Nasale Vakzinierung

2.3.1 Einleitung

Herkömmliche Impfstoffe werden häufig als Lösungen oder Suspensionen formuliert, die subkutan oder intramuskulär verabreicht werden. Bei der Entwicklung neuartiger Impfstoffe werden dagegen zunehmend auch andere Strategien der Vakzinierung, wie etwa die Immunisierung über Schleimhäute, evaluiert. Die meisten Pathogene dringen über die intestinalen und respiratorischen Schleimhäute in den Körper ein und können Infektionen verursachen (Mestecky et al., 1997). Daher sind zum Beispiel die Lunge und die Nase mit lymphatischen Geweben ausgestattet, die viele immunkompetente Zellen beherbergen, um Infektionen direkt nach dem ersten Erregerkontakt abzuwehren. Durch die Applikation von Impfstoffen über den Respirationstrakt kann daher nicht nur eine systemische, wie bei den herkömmlichen Impfstoffen, sondern zusätzlich eine mukosale Immunantwort hervorgerufen werden (Boyaka et al., 2005). Neben den immunologischen Aspekten bieten Impfstoffe, die nasal verabreicht werden, weitere Vorteile gegenüber konventionellen, parenteral zu applizierenden Impfstoffen. Diese wurden von Partidos (2000) und Sharma et al. (2008) zusammengefasst. Die Nase ist leicht zugänglich und bei Verwendung einer geeigneten Applikationshilfe können nasale Impfstoffe eigenständig, ohne die Hilfe von medizinischem Fachpersonal, appliziert werden. Dies erleichtert auch die Durchführung von Immunisierungen bei großen Bevölkerungsgruppen. Die Applikation wird vor allem dadurch erleichtert, dass keine Injektionsnadeln verwendet werden müssen. Daher werden auch Infektionen, die bei Injektionen auftreten können, ausgeschlossen (Csaba et al., 2009; Partidos, 2000).

In Deutschland ist bisher ein Impfstoff für die nasale Applikation auf dem Markt erhältlich. Das Fluenz® Nasenspray erhielt 2011 eine europaweite

Zulassung und dient der Influenza-Prophylaxe. Der Impfstoff besteht aus einer Suspension lebend-attenuierter Influenza-Viren und ist für Kinder und Jugendliche im Alter von 24 Monaten bis 18 Jahren zugelassen (Fachinformations Service, 2012b). In den USA ist der Impfstoff unter dem Namen FluMist® schon seit 2003, auch für Erwachsene bis 49 Jahre, zugelassen (MedImmune, 2012). Die Influenza-Viren in Fluenz® sind attenuiert, kälteadaptiert und temperaturempfindlich, das bedeutet, dass sie nicht pathogen und nur in einem bestimmten Temperaturbereich vermehrungsfähig sind. Infolgedessen vermehren sie sich hauptsächlich im Bereich des Nasopharynx und rufen eine protektive Immunität hervor. In pädiatrischen placebo-kontrollierten Studien konnte die Wirksamkeit von Fluenz® gezeigt werden und in aktiv-kontrollierten Studien mit injizierbaren Influenza-Impfstoffen hat sich der nasale Impfstoff als überlegen erwiesen. In Studien mit Erwachsenen konnte ein gesteigerter klinischer Nutzen allerdings nicht nachgewiesen werden (Fachinformations Service, 2012b).

Neben dem bereits zugelassenen nasalen Impfstoff werden in der Literatur viele Konzepte für Formulierungen zur nasalen beziehungsweise mukosalen Immunisierung beschrieben. Der Fokus liegt hierbei auf der Entwicklung partikulärer Formulierungen.

2.3.2 Nasales Lymphoidgewebe

Das Immunsystem des Menschen ist in verschiedene Kompartimente, die lymphatischen Gewebe, aufgeteilt. Zu den primären lymphatischen Organen gehören das Knochenmark, in dem die B-Zellen reifen, und der Thymus, der für die Reifung von T-Zellen verantwortlich ist. Zu den sekundären lymphatischen Organen zählen die Milz, die Lymphknoten und die sogenannten Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT, mucosa associated lymphoid tissue), das heißt, das Immunsystem der Schleimhäute.

Die Aufgabe der sekundären lymphatischen Gewebe ist die Entwicklung und Gewährleistung einer adaptiven Immunantwort (Vollmar und Dingermann, 2005; Janeway et al., 2002).

Das lymphatische Gewebe der Nase wird hauptsächlich durch die Tonsillen gebildet, die sich im Nasopharynx befinden. Die Tonsillen, zu denen die Rachenmandel (*Tonsilla pharyngea*), die paarigen Gaumenmandeln (*Tonsillae palatinae*), die Zungenmandel (*Tonsilla lingualis*) und die Tubenmandel (*Tonsilla tubaria*) gehören (Thews et al., 1999), stellen dabei einen lymphatischen Ring dar, der auch Waldeyer-Ring genannt wird (Blos, 1925). Der lymphatische Rachenring ist in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt. Das lymphatische Gewebe der Nase wird dem MALT zugeordnet und der Lokalisation entsprechend als Nasen-assoziiertes lymphatisches Gewebe (NALT, nose-associated lymphoid tissue) bezeichnet.

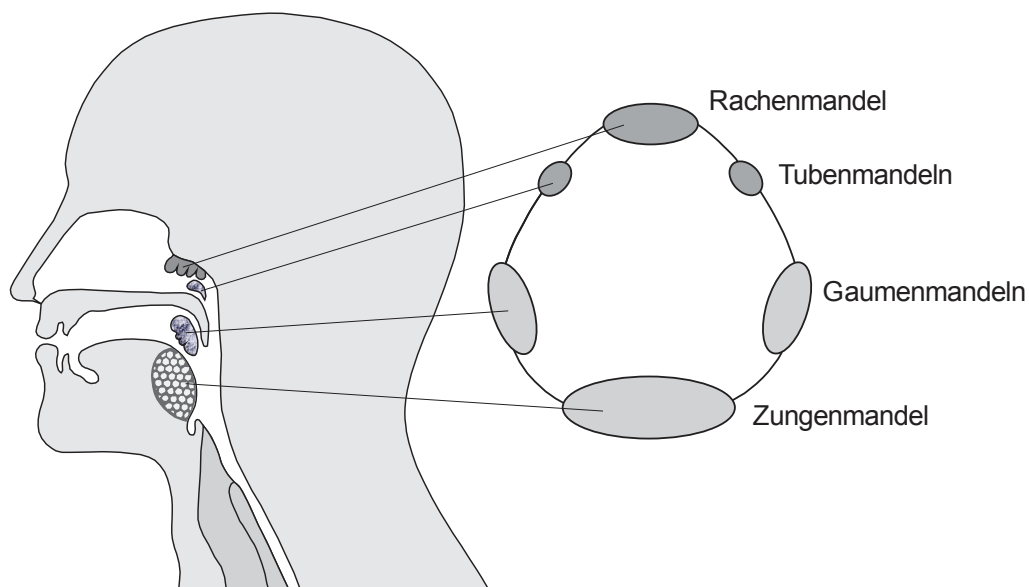


Abbildung 2.4: Lymphatischer Rachenring (Waldeyer-Ring); modifiziert nach Perry und Whyte (1998)

Das Epithel des NALT enthält spezialisierte Zellen, die sogenannten M-Zellen (microfold cells), die einen transepithelialen Transport von Makromolekülen, Partikeln und Mikroorganismen ermöglichen (Neutra et

al., 1996). Die apikale Seite der M-Zellen trägt, im Gegensatz zu den übrigen flimmerhaarbesetzten Epithelzellen, nur kleine, unregelmäßig geformte Zellfortsätze, wodurch die Aufnahme von Partikeln erleichtert wird (Clark et al., 2001). Die basolaterale Membran ist eingestülpt und bildet eine „Tasche“, die sowohl B- und T-Zellen als auch Makrophagen und dendritische Zellen enthält (Neutra et al., 1996). Neben den in Follikeln assoziierten Lymphozyten sind sowohl B- und T-Zellen als auch APC ungeordnet im lymphatischen Gewebe verteilt. Durch diese Anordnung der immunkompetenten Zellen und der M-Zellen kann ein effizienter Ablauf der Immunreaktion gewährleistet werden.

2.3.2.1 Systemische und lokale Immunantwort

Die Art der Wechselwirkung eines Antigens mit der nasalen Mukosa und dem NALT hängt von einer Vielzahl von Faktoren, wie zum Beispiel der Antigenmenge, der Häufigkeit der Applikation und den physikalischen Eigenschaften des Antigens, ab (Kuper et al., 1992).

Lösliche Antigene können das Epithel auf dem parazellulären Weg überqueren und werden von intraepithelialen oder submukosalen APCs aufgenommen. Diese APCs werden anschließend über die Lymphe zunächst zu den oberflächlichen und später zu den tiefen Halslymphknoten transportiert (Davis, 2001).

Partikuläre Antigene werden hauptsächlich durch M-Zellen via Transzytose aufgenommen und direkt an die im darunterliegenden Follikel befindlichen Immunzellen weitergegeben (Sharma et al., 2008).

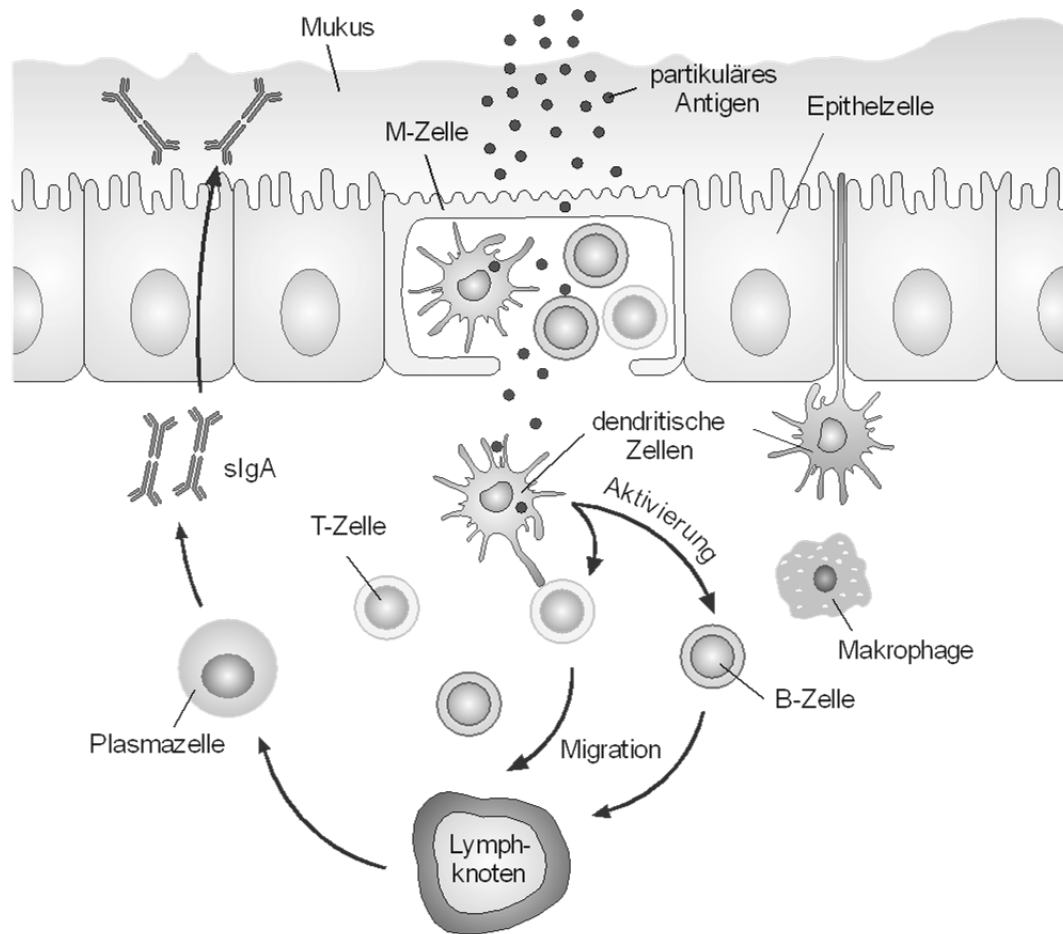


Abbildung 2.5: Lokale Immunantwort nach Immunisierung mit partikulären Antigenen, modifiziert nach Neutra und Kozlowski (2006)

Nach Aufnahme des Antigens wandern die APCs vornehmlich zu den tiefen Halslymphknoten (Kuper et al., 1992). In den Lymphknoten findet dann die Prozessierung und Präsentation des Antigens statt. Wie in Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben, werden zunächst T-Zellen aktiviert, die dann die B-Zellen unterstützen, sich zu antikörperproduzierenden Plasmazellen zu entwickeln. Die Natur des Antigens und die Lokalisation des Lymphknoten, in dem die Antigenpräsentation stattfindet, haben Einfluss auf die Art der Immunantwort. Lösliche Antigene können das gesamte nasale Epithel penetrieren und erreichen zunächst die oberflächlichen Lymphknoten. In diesem Fall kommt es vorzugsweise zu einer systemischen Immunantwort (Kuper et al., 1992), das heißt, die gebildeten Antikörper (meistens IgG und

IgM) werden überwiegend ins Blut abgegeben. Die Aufnahme von Partikeln und die Beteiligung des NALT führen dagegen überwiegend zu einer lokalen Prozessierung des Antigens unter Beteiligung der tiefen Halslymphknoten und daher wird nicht nur eine systemische, sondern überwiegend eine lokale Immunantwort induziert (siehe Abbildung 2.5). In diesem Fall entwickeln sich die B-Zellen hauptsächlich zu IgA-produzierenden Plasmazellen (Kuper et al., 1992). Die IgA-Antikörper können aktiv durch das Epithel transportiert werden und sind in der Lage Erreger, die sich auf der Nasalschleimhaut befinden, unschädlich zu machen (Vollmar und Dinger mann, 2005).

Die aktivierten T- und B-Zellen können außerdem von den tiefen Halslymphknoten durch die efferenten Lymphbahnen zu regionalen Lymphknoten zum Beispiel des Intestinal- und Urogenitaltrakts migrieren. Auch dort findet dann eine Differenzierung der B-Zellen und anschließend eine Sekretion von IgA-Antikörpern statt. Nasal applizierte partikuläre Antigene können daher nicht nur eine lokale Immunantwort in der Nase, sondern auch auf entfernten mukosalen Oberflächen hervorrufen. Dieser Zusammenhang wird auch „common mucosal immune system“ genannt (Sharma et al., 2008; Davis, 2001).

2.3.3 Anforderungen an eine optimale Formulierung

An eine Formulierung für die nasale Vakzinierung werden vielfältige Anforderungen gestellt. Diese wurden unter anderem von Slütter et al. (2008) und Sharma et al. (2008) zusammengefasst. Die Formulierung sollte partikulär sein, um eine effektive lokale und systemische Immunantwort hervorzurufen. In Studien mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass in Nano- beziehungsweise Mikropartikel inkorporierte Antigene (zum Beispiel Influenza, Hepatitis B, *Bordetella bronchiseptica*) eine deutlich stärkere

Immunantwort hervorrufen können als lösliche Antigene (Shephard et al., 2003; Feng et al., 2006; Kang et al., 2006). Bei der Entwicklung partikulärer Trägersysteme sind vor allem die physikochemischen Charakteristika zu berücksichtigen. Die Partikelgröße sollte im Bereich der Größe von Viren und Bakterien (20 nm bis 5 µm (Xiang et al., 2006)) liegen, damit eine effiziente Aufnahme über M-Zellen und APC gewährleistet werden kann. M-Zellen und Makrophagen sind in der Lage Partikel mit einer Größe von bis zu 5 µm aufzunehmen (Bhavsar und Amiji, 2007), allerdings erfolgt die Aufnahme von Nanopartikeln schneller als die von Mikropartikeln (Slütter et al., 2008). Außerdem können Nanopartikel im Gegensatz zu Mikropartikeln nicht nur durch M-Zellen, sondern auch durch Endozytose und parazellulären Transport das Epithel überqueren (Bhavsar und Amiji, 2007). Neben der Partikelgröße haben auch die Partikelladung und die Partikelform einen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme. Es konnte gezeigt werden, dass positiv geladene Partikel in größerem Ausmaß aufgenommen werden als negativ geladene (Gratton, 2008), möglicherweise aufgrund der Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran der M-Zellen, allerdings ist der Einfluss der Partikelladung noch nicht eindeutig evaluiert. Gratton et al. (2008) konnten außerdem zeigen, dass längliche Partikel schneller und effizienter aufgenommen werden als annähernd sphärische Partikel des gleichen Volumens.

Aufgrund der nasalen mukoziliären Clearance werden Partikel innerhalb von etwa 20 min von der Nasalmukosa entfernt und anschließend verschluckt (siehe Abschnitt 2.1.2). Damit eine effiziente Partikelaufnahme ermöglicht werden kann, sollte die Formulierung die Verweilzeit der Partikel auf der nasalen Schleimhaut verlängern. Daher werden in nasalen Impfstoffformulierungen häufig mukoadhäsive Polymere eingesetzt, die in drei Klassen unterteilt werden können: (I) hydrophile Polymere wie Natriumalginat und Natriumcarboxymethylcellulose, die über

Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Mukus interagieren können; (II) kationische Polymere, wie Chitosan und Chitosanderivate, die über ionische Kräfte mit dem negativ geladenen Mucin wechselwirken können und (III) Polymere mit Thiol-Gruppen, sogenannte Thiomere, wie das Polymer aus Chitosan und Thioglykolsäure (Bernkop-Schnürch, 2005), die mit Cystein-Resten des Mukus Disulfidbrücken bilden können (Slütter et al., 2008). Chitosan und seine Derivate zeigen zusätzlich auch einen adjuvanten Effekt und verstärken die Immunreaktion (Jabbal-Gill et al., 1998).

Neben den bereits beschriebenen Anforderungen sollte die Formulierung außerdem das Antigen vor der Denaturierung durch mukosale Enzyme schützen und dieses auch während der Lagerzeit stabilisieren. Parenterale Impfstoffe können nur als flüssige Darreichungsform, zum Beispiel als Lösung oder Suspension, formuliert werden. Diese müssen dann allerdings kühl gelagert werden, um die Stabilität des Antigens zu gewährleisten. Nasale Vakzine können dagegen auch als trockenes Pulver formuliert werden, welche den flüssigen Formulierungen in Bezug auf die Stabilität überlegen sind (Garmise, 2009). Während des Transports und der Lagerung besteht dann keine Kühlkettenpflicht, was die Impfstoffkosten deutlich senkt und die Handhabung vereinfacht. In der Literatur wurde bereits mehrfach die Entwicklung einer Trockenpulvervakzine für die Immunisierung gegen Influenza beschrieben (Garmise et al., 2006; Huang et al., 2004; Maa et al., 2004). Die Herstellung erfolgte dabei über die Gefriertrocknung beziehungsweise über die Sprüh-Gefriertrocknung (spray freeze drying) unter Verwendung verschiedener Hilfsstoffe wie Laktose, Trehalose oder Dextran. Huang et al. (2004) konnten zeigen, dass die Pulverformulierungen in Ratten eine Immunantwort induzieren und dass diese im Gegensatz zu flüssigen Formulierungen auch bei Raumtemperatur stabil sind. Neben diesen Influenza-Impfstoffen ist in der Literatur auch eine Pulverformulierung für die Impfung gegen Masern beschrieben (Lin et

al., 2011). Die Formulierung enthält lebende, attenuierte Masen-Viren und wird über ein spezielles Verfahren mit Hilfe von überkritischem Kohlenstoffdioxid hergestellt. Die Effektivität der Formulierung wurde in einer Studie mit Rhesusaffen gezeigt, welche den Tieren inhalativ und intranasal appliziert wurde. Lin et al. (2011) konnten damit zeigen, dass durch die Pulverformulierung eine anhaltende und effektive Immunisierung induziert werden konnte.

2.3.3.1 Partikuläre Formulierungen

Da partikuläre Formulierungen, wie bereits beschrieben, viele Vorteile gegenüber Impfstofflösungen sowohl für die nasale als auch für die parenterale Applikation bieten, sind in der Literatur viele Formulierungsansätze für diese Antigenträger beschrieben.

2.3.3.1.1 Mikro- und Nanopartikel

Mikro- und Nanopartikel werden in der Literatur häufig als Trägersystem für die Applikation nasaler Vakzine beschrieben. Diese können aus natürlichen oder synthetischen bioabbaubaren Polymeren bestehen und durch vielfältige Methoden hergestellt werden. Da diese Art der Trägersysteme Gegenstand dieser Arbeit sind, erfolgt eine ausführlichere Betrachtung in den Abschnitten 5.1 und 6.1.

2.3.3.1.2 Immunstimulierende Komplexe

Immunstimulierende Komplexe (ISCOMs, immunostimulating complexes) sind kolloidale, käfigähnliche Strukturen, die 1984 zum ersten Mal durch Morein et al. beschrieben wurden (Sharma et al., 2008; Morein et al., 1984). ISCOMs bilden sich spontan und bestehen aus dem Saponin Quil A, das aus der Rinde von *Quillaja saponaria* gewonnen wird, Cholesterol, Phospholipiden und dem Antigen (Pearse und Drane, 2005). Sie sind aus

regelmäßig angeordneten Untereinheiten aufgebaut und haben einen Gesamtdurchmesser von 40 nm (Sharma et al., 2008). Neben der immunstimulatorischen Wirkung der Saponine können ISCOMs aufgrund der Möglichkeit mit Zellmembranen zu fusionieren und das Antigen in das Zytosol übergeben zu können, eine verstärkte Immunreaktion hervorrufen (Wilson-Welder et al., 2009). Leere ISCOMs, die als Adjuvans und nicht zusätzlich auch als Trägersystem für das Antigen verwendet werden, werden auch ISCOMATRIX genannt (Pearse und Drane, 2005).

2.3.3.1.3 Liposomen

Liposomen sind Vesikel mit einer Größe von 20 nm bis zu einigen Mikrometern, die meistens aus Phospholipiden zusammengesetzt sind (Sharma et al., 2008; Gupta und Siber, 1995). Diese weisen sowohl hydrophobe als auch hydrophile Bereiche auf, so dass eine Vielzahl von Antigenen in Liposomen eingeschlossen oder an der Oberfläche adsorbiert werden können (Sharma et al., 2008). In den letzten 20 Jahren konnte in verschiedenen Studien immer wieder ein adjuvanter Effekt von Liposomen festgestellt werden, allerdings ist die Art der Immunreaktion von der Zusammensetzung, der Anzahl der Doppelmembranen (unilamellar oder multilamellar), der Ladung und der Herstellungsmethode der Liposomen abhängig (Gupta und Siber, 1995). Der adjuvante Effekt ist auf die gesteigerte Antigenaufnahme und -präsentation aufgrund der partikulären Natur der Liposomen sowie auf die Möglichkeit, mit der Zellmembran zu fusionieren, zurückzuführen (Sharma et al., 2008). Nachteilig ist, dass Liposomen, die aus Phospholipiden bestehen, sensitiv gegenüber Phospholipasen sind, eine geringe Lagerstabilität zeigen und hohe Produktionskosten verursachen.

2.3.3.1.4 *Virosomen*

Virosomen sind den unilamellaren Liposomen sehr ähnlich, allerdings beinhalten sie zusätzlich zu den Phospholipiden virale Glykoproteine wie das Hämagglutinin oder die Neuraminidase des Influenza-Viruses (Sharma et al., 2008). Diese 150 nm großen Partikel haben, wie der native Virus, eine Bindeaffinität zu Rezeptoren und imitieren eine Virusinfizierung, das heißt, sie werden in das Zytosol der Zelle aufgenommen und geben dort das inkorporierte Antigen frei (Wilson-Welder et al., 2009). Virosomen zeigen eine sehr hohe Immunogenität und werden unter anderem in dem Influenzaimpfstoff Inflexal V® eingesetzt, der allerdings parenteral appliziert wird (Fachinformations Service, 2012c).

3 Material

3.1 Modellantigene

Für die Entwicklung und Charakterisierung von Vakzinformulierungen ist es erforderlich neben den notwendigen Hilfsstoffen auch aktive Substanzen einzusetzen. Bestenfalls verwendet man dafür therapeutisch relevante Antigene. Da aber die Verwendung solcher Antigene in der Formulierungsphase aus Kostengründen und aufgrund von Sicherheitsaspekten nicht gerechtfertigt ist, werden in dieser Arbeit Modellantigene eingesetzt.

3.1.1 Bovines Serumalbumin

Serumalbumin ist ein globuläres Protein und gehört zu den wichtigsten Blutproteinen. Es ist unter anderem verantwortlich für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes und den Transport von verschiedenen endogenen und exogenen Substanzen. Bovines Serumalbumin (BSA) besteht aus 583 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 66500 Da. Es ist dem humanen Serumalbumin sehr ähnlich, denn die beiden Proteine sind in ihre Aminosäuresequenz zu 76% homolog (Huang et al., 2004). Die Sekundärstruktur von Albumin besteht überwiegend aus α -Helices und seine Konformation ist herzförmig (siehe Abbildung 3.1). Es ist zusammengesetzt aus drei Domänen mit jeweils zwei Subdomänen, die über Disulfidbrücken stabilisiert werden (Rothschild et al., 1988; Carter und He, 1990; Carter und Ho, 1994; Huang et al., 2004). BSA ist gut wasserlöslich und denaturiert ab einer Temperatur von etwa 60°C. Beim Überschreiten der Denaturierungstemperatur kommt es zu einer Auffaltung und β -Aggregation des Proteinmoleküls (Murayama und Tomida, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde lyophilisiertes BSA

Fraktion V mit einem Proteingehalt von > 97% der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

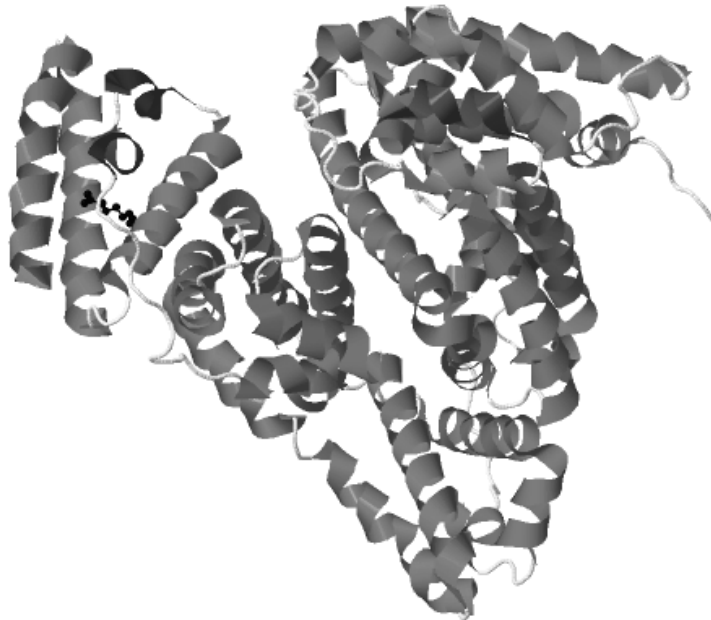


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung von BSA (RCSB Protein Data Bank)

3.1.2 Ovalbumin

Ovalbumin (OVA) ist das am häufigsten vorkommende Protein im Eiweiß von Hühnereiern und gehört aufgrund seiner Struktur zur Superfamilie der Serinproteaseinhibitoren (Serpine). Serpine zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass sie neun α -Helices, drei β -Faltblätter und ein reaktives Zentrum besitzen (Gettins, 2002; Silverman, 2001). OVA ist allerdings nicht in der Lage Serinproteasen zu inhibieren. Seine Funktion ist noch nicht endgültig aufgeklärt, aber wahrscheinlich handelt es sich um ein Speicherprotein. OVA ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 46000 Da und besteht aus 386 Aminosäuren (Huntington und Stein, 2001; McReynolds et al., 1978). Die Denaturierungstemperatur liegt bei 78°C. Allerdings gibt es neben der nativen Form (N-Ovalbumin), auch eine

stabilere Form, das S-Ovalbumin, mit einer Denaturierungstemperatur von 86°C. Dieses entsteht sowohl in-vitro durch Erhöhung der Temperatur und des pH-Wertes als auch in-vivo spontan während der Lagerung von Hühnereiern (Shinohara et al., 2005; Smith und Back, 1965).

In dieser Arbeit wurde lyophilisiertes N-OVA (Albumin from chicken egg white) mit einem Proteingehalt von > 98% der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) verwendet.



Abbildung 3.2: Schematische Darstellung von OVA (RCSB Protein Data Bank)

3.2 Polymere

3.2.1 Chitosan

Chitosan ist ein, nicht nur in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie, vielseitig verwendbares Biopolymer. Es ist ein Aminopolysaccharid bestehend aus β -1,4-glykosidisch verknüpften Glukosamin- und N-Acetylglukosamineinheiten (siehe Abbildung 3.3). Hergestellt wird Chitosan durch partielle Deacetylierung von Chitin, welches hauptsächlich

aus den Schalen von Krustentieren gewonnen wird. Chitosan ist in verdünnten Mineralsäuren und organischen Säuren löslich. Dabei werden die Aminogruppen protoniert und das Polymer liegt in Lösung als Polykation vor. Die Viskosität der Lösung wird dabei maßgeblich durch das Molekulargewicht bestimmt.

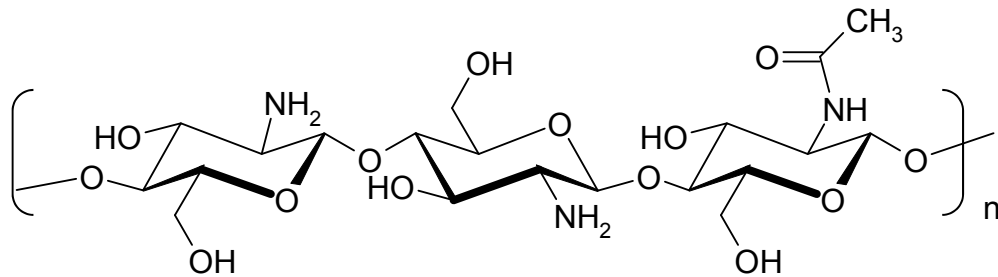


Abbildung 3.3: Ausschnitt aus der Strukturformel von Chitosan

Chitosan ist aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften und toxikologischen Unbedenklichkeit vielseitig verwendbar. Es wird zum Beispiel als Filtermaterial in der Wasseraufbereitung und als Lipidadsorbens in Medizinprodukten zur Gewichtskontrolle eingesetzt. Im pharmazeutischen Bereich wird Chitosan unter anderem verwendet, um Arzneiformen, zum Beispiel Tabletten oder Implantate, mit modifizierter Wirkstofffreisetzung zu entwickeln (Illum, 1998). Des Weiteren wird Chitosan auch als Hilfsstoff in der Entwicklung von Formulierungen für die Applikation von Proteinen und anderen polaren Arzneistoffen eingesetzt, da es die transmukosale Absorption von Wirkstoffmolekülen erhöhen kann. Zum einen kann Chitosan aufgrund seiner positiven Ladung mit negativ geladenen Zelloberflächen und Mukusproteinen interagieren, welches zu einer verlängerten Kontaktzeit der Formulierung mit Schleimhäuten führt und zum anderen kann es den parazellulären Transport durch die Öffnung von tight junctions erhöhen (Illum et al., 2001; Dodane et al., 1999). Außerdem wird Chitosan in Studien, zum Beispiel in Form von Mikro- und Nanopartikeln, für die nasale und inhalative Gabe von Impfstoffen genutzt

(Kang et al., 2009; Vila et al., 2004; Illum et al., 2001). Es zeigt einen adjuvanten Effekt und verstärkt somit die durch das Antigen hervorgerufene Immunreaktion (van der Lubben et al., 2001).

Für die Formulierungsentwicklung in dieser Arbeit wurde ChitoClear FG 95 der Firma Primex (Siglufjörður, Island) verwendet. Die eingesetzte Chitosanqualität hat einen Deacetylierungsgrad von $> 95\%$ und ein Molekulargewicht von etwa 102000 Da.

3.2.2 Agarose

Agarose ist ein Polysaccharid aus D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose (siehe Abbildung 3.4), welches aus Rotalgen, zum Beispiel aus Gelidium-Arten, gewonnen wird. Es wird hauptsächlich als Gelbildner in der Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren eingesetzt und ist neben Agaropektin Hauptkomponente des Agars.

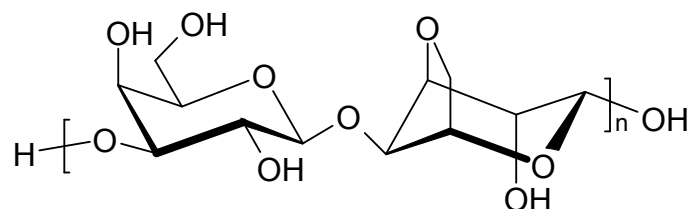


Abbildung 3.4: Ausschnitt aus der Strukturformel von Agarose

Agarose ist löslich in heißem Wasser und bildet nach Abkühlen unter die Gelbildetemperatur klare, feste Gele aus. Der Gel-Sol-Übergang des Hydrogels ist reversibel, da die Gelbildung auf Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polymermolekülen beruht, allerdings findet dies nur oberhalb des Schmelzpunktes von 65-85°C statt (Armisen und Galatas, 2000). Das bedeutet, dass ein Agarosegel erst bei einer Temperatur $> 65-85^{\circ}\text{C}$ wieder in den Sol-Zustand übergeht und flüssig wird. Außerdem ist Agarose inert, biokompatibel und hydrophil und

eignet sich aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften auch für die Herstellung von Proteinformulierungen (Wang und Wu, 1997). In dieser Arbeit wurde Agarose low EEO der Firma AppliChem (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

3.3 Trägermaterialien

Für die Entwicklung der mikropartikulären Pulverformulierungen wurden verschiedene Trägermaterialien evaluiert. Verwendet wurden für die Herstellung der Pulvermischungen die drei Zuckeralkohole Mannitol, Maltitol und Sorbitol und zwar in jeweils zwei Qualitäten unterschiedlicher Hersteller.

3.3.1 Mannitol

Mannitol (siehe Abbildung 3.5) leitet sich von dem Monosacharid D-Mannose ab und kommt in der Natur in einigen Pflanzen, wie zum Beispiel der Manna-Esche oder dem Feigenbaum, sowie in Pilzen und Algen vor. Industriell hergestellt wird der Zuckeralkohol durch die Hydrierung von Fruktose.

Mannitol wird unter anderem als Zuckeraustauschstoff in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie eingesetzt und dient als Füllstoff in der Tabletten- und Kapselherstellung. Außerdem wird es in der Arzneimitteltherapie als osmotisch wirkendes Diuretikum und Laxans sowie in der Therapie der cystischen Fibrose eingesetzt. Mannitol ist praktisch nicht hygroskopisch, gut wasserlöslich und weist keine reduzierenden Eigenschaften auf (Ammon, 2004). Für die Pulvermischungen wurden Pearlit 200 SD, welches eine sprühgranulierte Mannitolqualität ist, und Pearlit 160 C (beides von Roquette, LeStrem, Frankreich) verwendet.

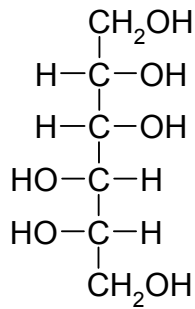


Abbildung 3.5: Strukturformel von Mannitol in der Fischerprojektion

3.3.2 Maltitol

Maltitol (siehe Abbildung 3.6) wird durch Reduktion des Disaccharids Maltose gewonnen und wird hauptsächlich in der Lebensmittelindustrie als Zuckeraustauschstoff verwendet. Es ist sehr leicht löslich in Wasser und zeigt eine geringe Hygroskopizität (Ammon, 2004).

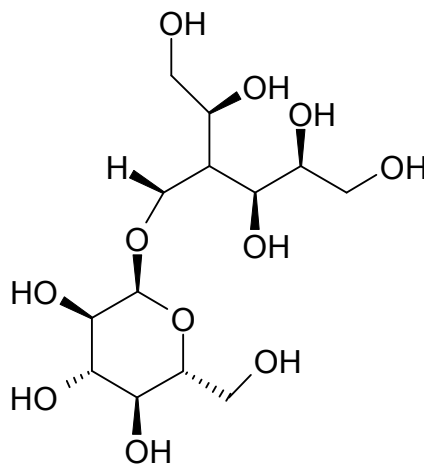


Abbildung 3.6: Strukturformel von Maltitol

In dieser Arbeit wurden die beiden Maltitolqualitäten SweetPearl P 90 (Roquette, LeStrem, Frankreich) und C*Maltidex (Cerestar AG, Krefeld, Deutschland) eingesetzt.

3.3.3 Sorbitol

Sorbitol (siehe Abbildung 3.7) kommt in vielen Früchten, besonders in Vogelbeeren und Kernobstsorten wie Birnen und Pflaumen, vor. Die industrielle Gewinnung erfolgt aus Mais- und Weizenstärke durch die Hydrierung von Glukose.

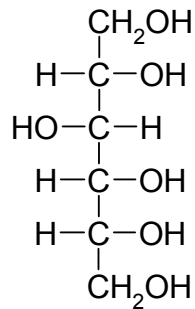


Abbildung 3.7: Strukturformel von Sorbitol in der Fischerprojektion

Sorbitol wird, wie auch andere Zuckeralkohole, als Zuckeraustauschstoff eingesetzt. Außerdem wird Sorbitol in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie als Feuchthaltemittel und Weichmacher, zum Beispiel in Süßwaren, Cremes und Kautabletten, verwendet. Es ist sehr gut wasserlöslich, allerdings zeigt Sorbitol, im Vergleich zu Mannitol und Maltitol, eine gesteigerte Hygroskopizität (Ammon, 2004). Als Trägermaterialien wurden C*PharmSorbidex (Cargill GmbH, Krefeld, Deutschland) und Neosorb P 100 T (Roquette, LeStrem, Frankreich) eingesetzt.

3.4 Applikationshilfen

Für die Administration von nasalen Zubereitungen wie zum Beispiel Lösungen oder Pulvern stehen verschiedene Applikationshilfen zur Verfügung. Grundsätzlich wird hierbei zwischen Mehrdosenbehältnissen für die wiederholte Anwendung und Einzeldosenbehältnissen für eine einmalige Gabe unterschieden. Häufig Verwendung findet ein aktives

Zerstäubersystem, bei dem die Formulierung durch einen speziellen Mechanismus der Applikationshilfe dispergiert wird. Passive Systeme, bei denen die Formulierung durch den Einatemstrom des Patienten durch die Nase eingesaugt wird, werden dagegen kaum noch angewendet. Bei der Auswahl einer geeigneten Applikationshilfe ist darauf zu achten, dass diese eine reproduzierbare Dosierung und eine gezielte intranasale Deposition der Formulierung gewährleistet. Darüber hinaus sollte sie für den Patienten einfach zu handhaben sein.

3.4.1 PowderJet

Bei dem PowderJet (RPC Formatec, Mellrichstadt, Deutschland) handelt es sich um ein Mehrdosensystem für die nasale Applikation von Pulverformulierungen (siehe Abbildung 3.8). Beim Auslösen, das heißt beim Zusammendrücken, der Applikationshilfe wird im unteren Teil des Systems Luft komprimiert, welche durch eine permeable Membran in die Dosierkammer strömt. Gleichzeitig wird die Dosierkammer nach unten in das Pulverbett gedrückt. Dabei öffnet sich diese und teilt eine Pulverdosis ab, welche durch die einströmende Luft mitgerissen wird. Die Pulverdosis wird dann durch den Luftstrom über den Austragskanal bis zur Öffnung des Nasenadapters transportiert und dispergiert. Neben dem innovativen Dosiermechanismus weist der PowderJet eine hohe Benutzerfreundlichkeit durch leichte Handhabung auf und ist in der Lage Pulverformulierungen effektiv und reproduzierbar zu dispergieren.

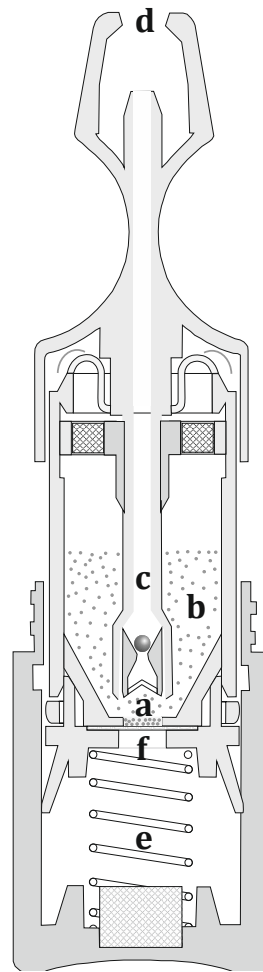


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung (Längsschnitt) des PowderJets

- | | |
|--------------------------|-------------------------|
| <i>a – Dosierkammer</i> | <i>b – Pulverbett</i> |
| <i>c – Austragskanal</i> | <i>d – Nasenadapter</i> |
| <i>e – Feder</i> | <i>f – Membran</i> |

3.4.2 Powder UDS

Das Powder UDS (Aptar Pharma, Louveciennes, Frankreich) ist eine Applikationshilfe für die Einmalapplikation von Pulverformulierungen (siehe Abbildung 3.9). Die Pulverdosis (bis zu 50 mg) befindet sich in einer kleinen Kartusche, welche oben durch eine Kugel und unten durch einen Kunststoffdorn verschlossen ist. Beim Auslösen der Applikationshilfe wird die Kugel durch den Dorn nach oben gedrückt und die Kartusche so an beiden Enden geöffnet. Durch den beim Zusammendrücken im unteren Teil

der Applikationshilfe erzeugten Luftstrom wird die Pulverdosis dabei durch den Austragskanal nach oben befördert und anschließend dispergiert. Das Powder UDS basiert auf einem einfachen Dispergiermechanismus, welcher aber sehr effektiv ist und ist einfach zu handhaben.

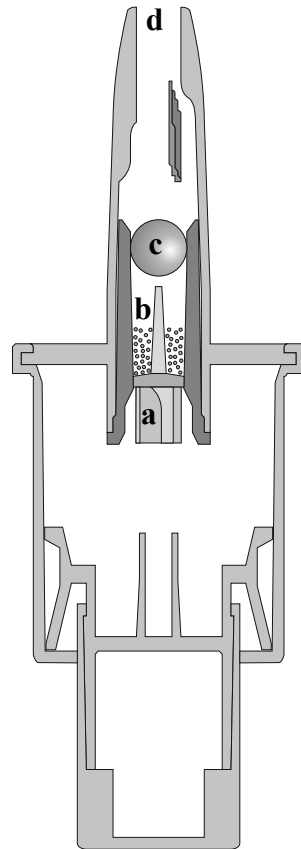


Abbildung 3.9: Schematische Abbildung (Längsschnitt) des Powder UDS

a – Kunststoffdorn b – Pulverdosis
c – Kugel d – Austragskanal

4 Methoden

4.1 Präparative Methoden

4.1.1 Sprühtrocknung

Das Verfahren der Sprühtrocknung wird angewendet, um Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen in trockene Pulver zu überführen (Büchi, 2007). Hierzu wird das zu trocknende Gut mittels einer Düse in feine Tröpfchen zerstäubt und in einen warmen Gasstrom, in der Regel Luft oder Stickstoff, eingesprüht. In Laborgeräten erfolgt die Zerstäubung der Flüssigkeit häufig durch eine Zweistoffdüse, welche in Abhängigkeit von der Sprühgasmenge und -geschwindigkeit Tröpfchen im Bereich von 5-20 μm produziert. Sprühtrockner im Produktionsmaßstab dagegen verfügen oft über eine Zerstäuberscheibe, bei welcher ein entstehender Flüssigkeitsfilm durch Zentrifugalkräfte am Rand der sich drehenden Scheibe in feine Tröpfchen zerrissen wird. Mit dem Auftreffen der Tröpfchen auf den warmen Gasstrom beginnt sofort die Trocknung. Das Lösungsmittel verdampft beginnend von der Tröpfchenoberfläche und es bildet sich zunächst eine Hülle aus getrocknetem Feststoff. Im Verlauf der Trocknung nimmt der Druck innerhalb der Partikel durch weiteres Verdampfen des Lösungsmittels zu und als Folge bricht die Hülle häufig an der dünnsten Stelle auf (charakteristisches „Ausblasloch“) oder das gesamte Partikel kollabiert (Vehring, 2008). Sprühgetrocknete Produkte weisen dadurch oft eine Hohlkugelstruktur auf. Nach Beendigung der Trocknung werden die Partikel mit Hilfe eines Zyklons abgeschieden und in das Auffanggefäß überführt. Die Größe der abgeschiedenen Partikel ist überwiegend abhängig von der primären Tröpfchengröße, dem

Feststoffanteil und der Abscheidefähigkeit des Zyklons (Elversson et al., 2003).

Das Verfahren der Sprühtrocknung ist insgesamt ein schneller und schonender Prozess und daher gut für die Trocknung von Proteinlösungen geeignet. Die Zerstäubung des zu trocknenden Gutes in feine Tröpfchen resultiert in einer großen Oberfläche, wodurch es zu einer raschen Trocknung kommt. Außerdem sorgt die bei der Verdampfung des Lösungsmittels entstehende Verdunstungskälte dafür, dass die Partikel sich trotz der heißen Trocknungsluft nicht zu stark erwärmen, wodurch die thermische Belastung des Produktes gering bleibt.

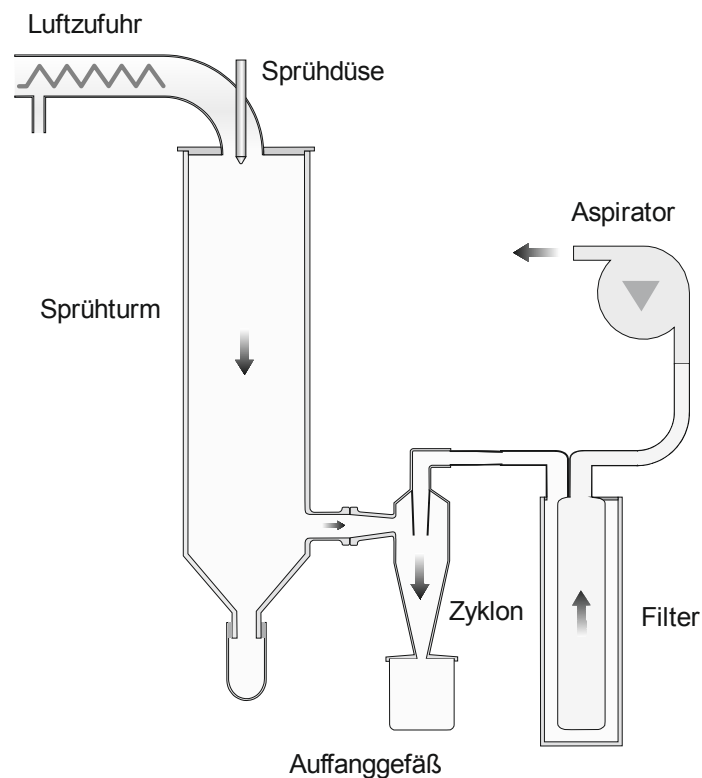


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Sprühtrocknungsprozesses

Für diese Arbeit wurde ein B-290 Laborsprühtrockner (Büchi, Flawil, Schweiz) eingesetzt (siehe Abbildung 4.1). Dieser arbeitet im Gleichstromverfahren und ist mit einer pneumatisch selbstreinigenden Zweistoffdüse (innerer Düsendurchmesser 1,2 mm) ausgestattet. Zum

Auffangen der Partikel wurde ein Hochleistungszyklon verwendet, der es ermöglicht, auch Partikel mit einer Größe im unteren Mikrometerbereich abzuscheiden. Nicht abgeschiedene Partikel werden im nachgeschalteten Filter aufgefangen. Die Prozessparameter des Trocknungsvorganges müssen dem jeweiligen Produkt angepasst werden. Die Zulufttemperatur kann in einem Bereich bis 220°C gewählt werden und die Ablufttemperatur ergibt sich dann aus der eingestellten Zulufttemperatur und der Sprühdauer. Die Produkttemperatur entspricht maximal der Ablufttemperatur, das heißt sie sollte bei temperaturempfindlichen Stoffen, wie beispielsweise Proteinen, möglichst niedrig gewählt werden. Außerdem sollte die Differenz zwischen Zu- und Ablufttemperatur nicht zu groß gewählt werden, da sonst keine effektive Trocknung möglich ist. Die Angaben zu den verwendeten Prozessparametern befinden sich in den jeweiligen Kapiteln.

4.1.2 Mischungsprozess

Für die Herstellung von Pulvermischungen wurde ein Turbulamischer (W.A. Bachofen AG Maschinenfabrik, Basel, Schweiz), welcher der Gruppe der Freifallmischer zuzuordnen ist, verwendet. Durch die dreidimensionale Drehbewegung wird eine schonende und effektive Durchmischung der Komponenten erreicht. Mit Hilfe von Vorversuchen wurde eine optimale Mischungsdauer von 15 min bei 42 rpm ermittelt, wobei die Mischung jeweils nach 5 min durch ein Sieb der Maschenweite 300 µm gesiebt wurde, um eventuell vorhandene Agglomerate zu zerstören.

Weitere in dieser Arbeit verwendete präparative Methoden beziehen sich nur auf einzelne Teile der Arbeit und werden daher in den entsprechenden Kapiteln behandelt.

4.2 Analytische Methoden

4.2.1 Partikelgrößenbestimmung

Viele Eigenschaften eines Stoffes, wie zum Beispiel die Lösungsgeschwindigkeit, die Fließfähigkeit oder auch das Verhalten in einem Luftstrom, sind eng mit der Größe der Partikel verknüpft. Um die Partikelgröße beziehungsweise Partikelgrößenverteilung zu bestimmen, gibt es unterschiedliche Messverfahren, wobei man grundsätzlich zwischen Zähl- und Mengenmessverfahren unterscheidet. Zu den Zählverfahren gehören die Auswertung mikroskopischer oder elektronenmikroskopischer Bilder sowie das Impulsverfahren, auch Coulter-Counter-Methode genannt. Die klassische Siebanalyse sowie die Streulichtverfahren, zu denen die Laserdiffraktometrie und Photonenkorrelationsspektroskopie gehören, zählen zu den Mengenmessverfahren. Bei allen Messverfahren ist zu beachten, dass die Größe eines Partikels nur dann exakt durch den Durchmesser beschrieben werden kann, wenn dieses kugelförmig ist. Da dies häufig nicht zutrifft, werden je nach Messmethode verschiedene statistische Durchmesser oder Äquivalentdurchmesser, wie der Durchmesser nach Feret oder Martin, der Siebdurchmesser oder der hydrodynamische Durchmesser, zur Größenangabe verwendet. Außerdem unterscheiden sich je nach verwendetem Verfahren die Partikelgrößenverteilungen. Bei den Zählverfahren wird zusätzlich zur Partikelgröße auch die Partikelanzahl erfasst, was dazu führt, dass alle Teilchengrößen untereinander gleich gewichtet werden (Anzahlverteilung). Bei den Mengenmessverfahren hingegen werden größere Partikel stärker gewichtet als kleinere, da diese eine größere Masse und ein größeres Volumen haben. Die Partikelgrößenverteilung ist damit zu größeren Partikeln hin verschoben (Massen- beziehungsweise Volumenverteilung).

4.2.1.1 Laserdiffraktometrie

Das Verfahren der Laserdiffraktometrie, auch Laserbeugung genannt, eignet sich dazu, schnell und zuverlässig Partikelgrößenverteilungen von Pulvern, Dispersionen, Emulsionen und Aerosolen zu bestimmen. Dafür werden die Partikel mittels eines Aufgabe- und Dispergiersystems in einen aufgeweiteten Laserstrahl eingebracht. Der Laserstrahl wird an der Partikeloberfläche gebeugt und das dabei entstehende charakteristische Beugungsmuster aus konzentrisch angeordneten Ringen auf dem Detektor abgebildet. Anhand der Intensität und Größe des Beugungsmusters kann dann mit Hilfe eines optischen Modells und eines mathematischen Algorithmus die Partikelgrößenverteilung (Volumenverteilung) berechnet werden. Die Berechnung basiert dabei entweder auf der Fraunhofer- oder der Mie-Theorie. Im Gegensatz zur Fraunhofer-Annäherung berücksichtigt die Mie-Theorie nicht nur die Lichtbeugung, sondern auch die Lichtabsorption, -reflexion und -streuung an der Partikeloberfläche und ist in der Wiedergabe von Partikelgrößenverteilungen, auch im unteren Mikrometerbereich, sehr exakt. Allerdings müssen für die Umrechnung der Intensitätsverteilung in die Volumenverteilung die optischen Eigenschaften, wie der komplexe Brechungsindex, der Partikel bekannt sein. Die Fraunhofer-Theorie hingegen stellt eine parameterfreie Lösung dar, die auch für Stoffgemische gut geeignet ist. Beide Theorien haben gemeinsam, dass sie streng genommen nur für sphärische Partikel gültig sind, da sie als Berechnungsgrundlage eine ideale Kugel voraussetzen (Sympatec GmbH, 2011; Kuhli, 2009).

In dieser Arbeit wurde ein HELOS Laserdiffraktometer mit modularem Aufbau der Firma Sympatec verwendet (Sympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland). Das Diffraktometer arbeitet mit einem Helium-Neon-Laser der Wellenlänge 623,8 nm und kann mit Linsen verschiedener Brennweiten ausgestattet werden, wodurch ein variabler Messbereich von

0,1 µm bis 8750 µm ermöglicht wird. Es wurde je nach Fragestellung mit einem der folgenden Aufgabesysteme gearbeitet:

- RODOS

Das zu vermessende Pulver wurde mit einem Druck von 3 bar dispergiert und sogleich in die Messzone eingebracht. Der Messvorgang wurde bei Erreichen einer optischen Konzentration von $\geq 0,2\%$ ausgelöst. Bei dieser Methode wurde davon ausgegangen, dass das Pulver durch die Druckluft vollständig dispergiert wurde und keine Agglomerate mehr vorhanden waren.

- SPRAYER

Das SPRAYER-Modul ermöglicht die Messung von Partikelgrößenverteilungen direkt nach Dispergierung durch Applikationshilfen, wie z.B. Nasensprays oder Dosieraerosolen. Bei Messungen mit dem PowderJet und dem Powder UDS wurde die jeweilige Applikationshilfe waagrecht in das Aufgabesystem eingespannt. Der Abstand zur Messzone betrug 10 cm und der Sprühstoß wurde durch einen Aktuator mit einer Kraft von 60 N ausgelöst. Um den Messvorgang auszulösen, musste eine optische Konzentration von mindestens 0,2% in der Messzone erreicht werden. Der Messaufbau ist schematisch in Abbildung 4.2 dargestellt.

- CUVETTE

Zur Nassdispergierung wurden die Pulver in einem Nichtlösemittel (Isopropanol oder mittelkettige Triglyceride) mit Hilfe eines Ultraschallbades 30 s dispergiert und in eine 6 ml Quarzküvette überführt, die in der Messzone fixiert wurde. Die optische Konzentration der Dispersion lag bei den Messungen zwischen 10 und 20%.

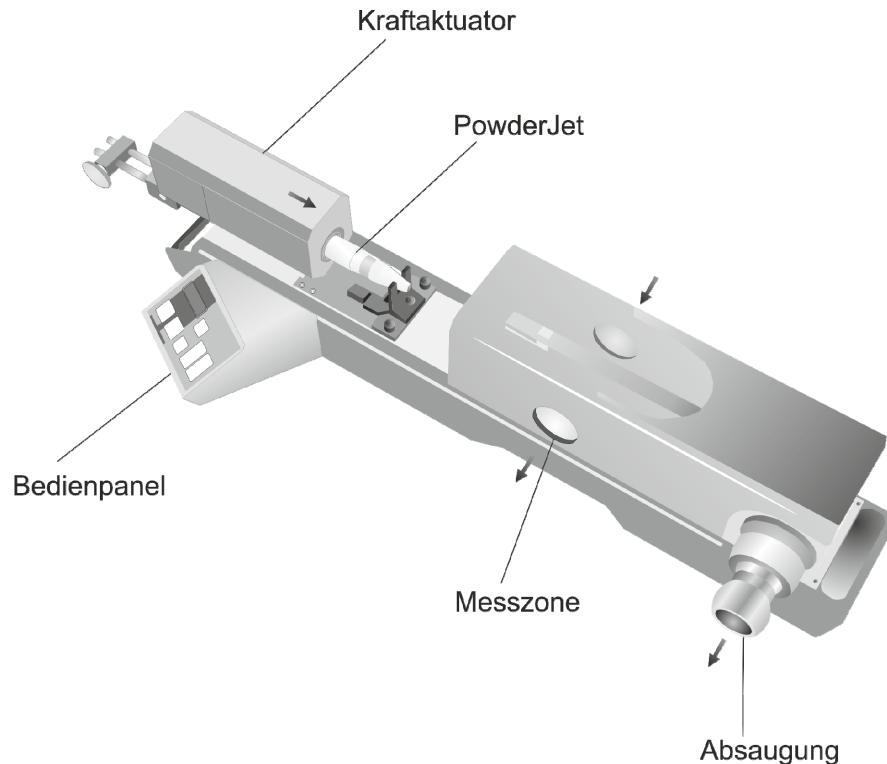


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Messaufbaus mit dem SPRAYER-Modul

Für jede Messung wurde je nach erwarteter Partikelgrößenverteilung eine geeignete Linse (R1 – R4) ausgewählt und mindestens eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Eine Referenzmessung wurde bei der Trockendispergierung mit Luft und bei der Nassdispergierung mit reinem Dispersionsmittel durchgeführt. Die Datenauswertung erfolgte mit der Windox Software (Version 5.4.2.2, Sympatec) nach der Fraunhofer-Annäherung. Die Partikelgrößenverteilungen wurden dann entweder als Summenhäufigkeitskurve oder Dichteverteilung dargestellt. Als Kenngrößen der Partikelgrößenverteilungen wurden der x_{10} , x_{50} und x_{90} berechnet.

4.2.1.2 Photonenkorrelationsspektroskopie

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), auch dynamische Lichtstreuung genannt, wird verwendet, um die Partikelgrößenverteilung von Partikeln im Nanometerbereich zu bestimmen. Die Nanopartikel liegen dafür in einer kolloidalen Dispersion vor und werden von einem monochromatischem Laserlicht beleuchtet. Das Licht wird an den Partikeln gestreut und die Intensität des Streulichtes wird zeitabhängig auf einem Detektor im Winkel von 173° registriert. Da die Nanopartikel sich aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung in dem Dispersionsmittel ungerichtet bewegen, ist die Streulichtintensität nicht konstant, sondern unterliegt Schwankungen. Durch die Korrelation des Messsignals zum Zeitpunkt t mit Messsignalen zu späteren Zeitpunkten $t+\delta t$, dieses geschieht im Bereich von Nanosekunden, ergibt sich eine Korrelationsfunktion (Abklingkurve), die exponentiell abfällt und gegen Null strebt. Da kleine Partikel sich im Dispersionsmedium schneller bewegen als große Partikel, verursachen diese schnellere Veränderungen in der Streulichtintensität und die Abklingkurve verläuft steiler, als die von großen Partikeln. Mit Hilfe eines mathematischen Algorithmus kann dann anhand dieser Korrelationsfunktion die Partikelgröße berechnet werden (Malvern Instruments, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Größenmessungen der Nanopartikel mit einem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, UK) durchgeführt. Dieser ist in der Lage Partikelgrößen in einem Bereich von 0,6 nm bis 6 μm zu bestimmen. 1 ml der zu vermessenden Nanosuspension wurde hierfür in eine Küvette überführt und im Messgerät 2 min bei 20°C equilibriert. Es wurde eine manuelle Messmethode ausgewählt, bei der eine Messung aus 10 Einzelmessungen von je 30 s bestand und es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Da die Diffusionsgeschwindigkeit der Nanopartikel nicht nur von der

Partikelgröße und Temperatur, sondern auch von der Viskosität der Nanosuspension abhängt, wurde diese mit Hilfe eines Vibrations-Viskosimeters (A&D Company Ltd., Tokio) vor jeder Messung bestimmt. Die Datenauswertung erfolgte mit der Zetasizer-eigenen Software (Version 6.12, Malvern Instruments). Die Partikelgrößenverteilungen können hierbei nicht nur als Intensitätsverteilung dargestellt werden, sondern es können auch die Volumen- und Anzahlverteilung berechnet werden. Der z-average, auch cumulants mean, gibt die über alle Verteilungen gemittelte Partikelgröße an und ist damit ein charakteristischer Parameter zur Beschreibung der Partikelgröße. Allerdings ist dieser nur aussagekräftig, wenn es sich um eine monomodal verteilte Probe handelt. Ein Maß für die Breite der Verteilung ist der Polydispersitätsindex (PDI). Eine ideal monodisperse Probe weist einen PDI von 0 auf, eine sehr breit verteilte Probe maximal einen PDI von 1. Damit eine Messung noch sinnvoll auswertbar ist, sollte der $PDI \leq 0,5$ sein (Malvern Instruments, 2004).

4.2.2 Gleichförmigkeit der abgegebenen Masse

Zur Evaluierung der Dosiergenauigkeit des PowderJets wurden 30 Dosen der jeweiligen Formulierung abgegeben und die Applikationshilfe nach jedem Sprühstoß gewogen, um die Masse der jeweiligen Einzeldosis zu bestimmen. Für die Auswertung wurden die mittlere abgegebene Dosis, die relative Standardabweichung sowie die Grenzen von $\pm 20\%$ vom Mittelwert berechnet. Da es keine Arzneibuchmethode für die Bestimmung der Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis von nasalen Pulverformulierungen gibt, wurden die Untersuchungen in Anlehnung an die Methode zur Testung nasaler Sprays aus dem aktuellen nordamerikanischen Arzneibuch (United States Pharmacopeia, USP) durchgeführt (USP, 2011).

Zur Beurteilung der Dosiergenauigkeit des Powder UDS wurden 30 Applikationshilfen mit jeweils 50 mg der zu untersuchenden Formulierung

befüllt und anschließend ausgelöst. Die abgegebene Masse wurde durch Rückwägung der Applikationshilfe bestimmt und die Dosis als prozentualer Anteil der abgegebenen Masse an der initialen Füllmasse ausgedrückt. Außerdem wurde auch hier die mittlere abgegebene Dosis, die relative Standardabweichung und die Grenzen von $\pm 20\%$ vom Mittelwert berechnet.

4.2.3 Nasale Deposition

Zur Charakterisierung und Optimierung von Formulierungen für die nasale Anwendung sind Kenntnisse über die Deposition in der Nasenhöhle von großem Nutzen. Depositionsprofile zeigen auf, in welchen Abschnitten und in welchem Ausmaß sich die applizierte Formulierung in der Nase abscheidet. Für in-vivo Depositionsstudien werden häufig radioaktiv markierte Substanzen nasal verabreicht und das Depositionsmuster wird dann mittels γ -Szintigraphie aufgezeichnet (Hardy et al., 1985; Fry und Black, 1973). Da dieses Verfahren mit einer vergleichsweise hohen Strahlenbelastung für den Probanden verbunden ist, finden heute zunehmend auch künstliche Nasenmodelle Verwendung. Diese Modelle werden entweder aus postmortalen Abdrücken menschlicher Nasenhöhlen oder anhand computer- beziehungsweise magnetresonanztomographischer Aufnahmen lebender Probanden gefertigt (Guilmette und Gagliano, 1994; Swift, 1991; Hughes et al., 2008). Letztere sind in der Wiedergabe der Nasenanatomie und -geometrie deutlich präziser, da sich das Nasengewebe postmortal verändert (Häußermann et al., 2002). Außerdem besteht mittlerweile die Möglichkeit, Depositionsuntersuchungen in-silico durchzuführen. Dafür wird die nasale Deposition von z.B. Partikeln am Computer mit Hilfe von CFD (computational fluid dynamics) simuliert (Li et al., 2012).

Die nasale Deposition wird grundsätzlich durch mehrere Faktoren beeinflusst. Dazu gehören unter anderem die Partikelgröße, die Art und Anwendungstechnik der Applikationshilfe, die Luftströmungsgeschwindigkeit und die Geometrie der Nase (Kundoor und Dalby, 2011; Cheng et al., 1991). Die Partikelgröße hat dabei auch Einfluss auf den Mechanismus der Deposition: Partikel $> 1 \mu\text{m}$ werden hauptsächlich durch Impaktion, aber auch durch Sedimentation abgeschieden, Partikel $< 0,5 \mu\text{m}$ nur durch Diffusion (Kublik und Vidgren, 1998; Lippmann et al., 1980). Sehr kleine Partikel sind daher eher in der Lage, dem Luftstrom in der Nase zu folgen und werden entweder erst in hinteren Bereichen, wie zum Beispiel dem Nasopharynx, abgeschieden oder können sogar die Lunge erreichen.

Um die nasale Deposition der hergestellten Formulierungen zu untersuchen wurde ein Nasenmodell (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) verwendet, welches auf einem CT-Scan einer männlichen, menschlichen Nase beruht. Das Modell ist in fünf Segmente unterteilt: die Nasenlöcher, den Nasenvorhof, die untere Nasenmuschel, die mittlere und obere Nasenmuschel und den Nasopharynx (siehe Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4 a und b). Mit Hilfe dieses teilbaren Modells ist es möglich, die Deposition in den einzelnen Nasenabschnitten zu bestimmen.

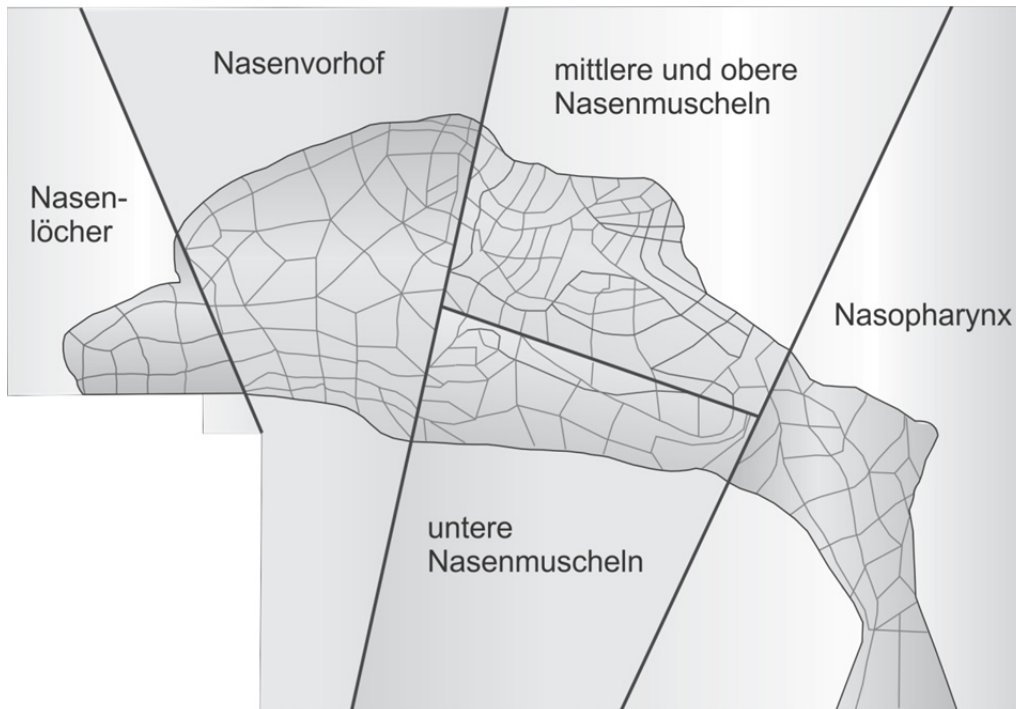


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Nasenmodells, modifiziert nach Schoenbrodt et al. (2010)

Die einzelnen Segmente werden durch einen Spanrahmen zusammengehalten und am hinteren Auslass kann optional eine Vakuumpumpe zur Erzeugung eines Luftstromes angeschlossen werden. Die Messungen wurden mit einer Flussrate von 15 l/min (Schoenbrodt et al., 2010) und 0 l/min durchgeführt, um einerseits einen normalen Einatemstrom, andererseits Luftanhalten zu simulieren. Außerdem wurden alle Depositionsuntersuchungen unter klimatisierten Bedingungen, das heißt bei einer Temperatur von 21°C und einer relativen Feuchte von 45% durchgeführt. Diese Bedingungen entsprechen der gemäßigten Klimazone. Vor jeder Messung wurden die einzelnen Segmente mit einer Mischung aus Propylenglykol und Isopropanol im Verhältnis 1+1 beschichtet, um das Abprallen der Partikel von den Innenflächen des Modells zu minimieren. 50 mg der entsprechenden Formulierung wurden dann mit Hilfe des PowderJets bzw. des Powder UDS appliziert. Die post-nasale Fraktion, also der Anteil der Formulierung, der nicht intranasal abgeschieden wurde,

wurde entweder in einem Becherglas (Messungen bei 0 l/min) oder auf einem 0,45 µm Cellulosenitratfilter (Messungen bei 15 l/min), der zwischen Nasopharynx und Vakuumpumpe platziert wurde, aufgefangen.

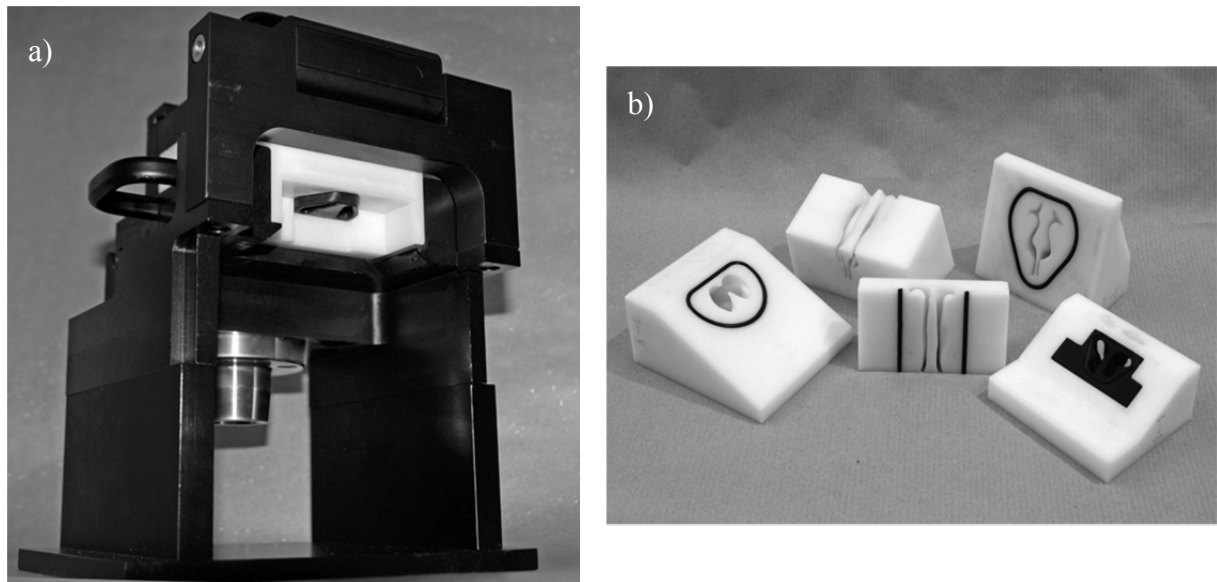


Abbildung 4.4: Fotos des verwendeten Nasenmodells a) Spannrahmen mit der künstlichen Nasenkavität b) einzelne Segmente

Nach Applikation der Formulierung wurden die einzelnen Segmente und das Becherglas beziehungsweise der Filter ausgespült. Bei chitosanhaltigen Formulierungen wurde 0,001 N Salzsäure pH 2,6 verwendet und bei den nanopartikulären Formulierungen Aqua bidest. Um den Proteingehalt störungsfrei mittels BCA-Assay (siehe Abschnitt 4.2.5.1) quantifizieren zu können, wurde das Chitosan durch Erhöhung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich ausgefällt und mittels Zentrifugation (15 min bei 6000 *g*) abgetrennt. Die Nanopartikel enthaltenden Proben dagegen wurden zunächst auf 50°C erwärmt, um die Partikelstruktur zu zerstören und das Protein freizusetzen, und nach Erkalten wurde die Agarose ebenfalls mittels Zentrifugation (10 min bei 14000 *g*) abgetrennt.

Anhand der Ergebnisse aus der Proteinquantifizierung wurden die Depositionsprofile, dargestellt als Mittelwert der prozentualen

Proteinmenge pro Segment, und die Wiederfindung, welche für alle Bestimmungen zwischen 80-120% lag, berechnet. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Beurteilung der Ergebnisse wurde ein Idealprofil berechnet. Dieses basiert auf der Annahme einer gleichmäßigen Verteilung der Formulierung auf der inneren Oberfläche der einzelnen Nasenmodellsegmente und schließt die unerwünschte Deposition in den Nasenlöchern sowie eine post-nasale Fraktion aus. Außerdem wurde der Ähnlichkeitsfaktor anhand des modifizierten f_2 -Konzeptes (siehe Abschnitt 4.3.1) berechnet, um die Vergleichbarkeit der Deposition im Nasenvorhof, in den Nasenmuscheln und im Nasopharynx innerhalb der Dreifachbestimmungen beurteilen zu können.

4.2.4 Bildgebende Verfahren

Mit Hilfe von bildgebenden Verfahren können Partikel hinsichtlich ihrer Morphologie und Oberflächenbeschaffenheit charakterisiert werden. Außerdem kann, ergänzend zur Laserdiffraktometrie und Photonenkorrelationsspektroskopie, die Größe von Partikeln bestimmt werden.

4.2.4.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Darstellung von Partikeloberflächen der Trägermaterialien und Formulierungen erfolgte mittels rasterelektronenmikroskopischer Bilder. Zur Erzeugung eines Bildes der Objektoberfläche wird bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) ein gebündelter Elektronenstrahl über die im Hochvakuum befindliche, leitfähige Probe geführt. Die Elektronen wechselwirken mit der Probe und werden zurückgestreut oder erzeugen aus dem Objekt wieder austretende Sekundärelektronen. Die

Rückstreu- oder Sekundärelektronen werden auf einem Detektor registriert und die Detektorsignale in Bildpunkte umgewandelt.

In dieser Arbeit wurde ein Zeiss DSM 940 Rasterelektronenmikroskop (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden auf doppelseitig klebende Leit-Tabs (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland), die auf Aluminiumprobenhaltern befestigt wurden, aufgestreut. Die Proben wurden dann unter Argon-Atmosphäre (50 Pa) bei 50 mA für 65 s mit Gold beschichtet (Sputter Coater SCD 005, BalTec AG, Liechtenstein), um eine leitende Oberfläche zu erhalten.

4.2.4.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Das Verfahren der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde verwendet, um Morphologie und Größe der Nanopartikel zu charakterisieren. Anders als bei der Rasterelektronenmikroskopie wird bei der Transmissionselektronenmikroskopie die gesamte Probe mit Elektronen durchstrahlt, welche in der Probe gestreut werden. Die gestreuten Elektronen werden fokussiert und die vergrößerte Objektabbildung wird wiedergegeben. Voraussetzung für die Transmissionselektronenmikroskopie ist, dass die Probe sehr dünn und damit elektronentransparent ist.

Die Aufnahmen der Nanopartikel wurden mit Hilfe eines Tecnai Spirit Transmissionselektronenmikroskops (Fei Company, Hillsboro, OR, USA) angefertigt. Die Probenpräparation erfolgte durch Auftragen der Nanosuspension auf ein Kupfernetz, welches mit Pioloform (Acetal des Polyvinylalkohols) beschichtet und mit Kohlenstoff bedampft ist (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) und anschließendem Abtrocknen. Um einen guten Kontrast zu erhalten wurde eine Negativfärbung mit einer Lösung aus Methylaminvanadat (NanoVan, Nanoprobes Inc., Yaphank, NY, USA)

durchgeführt. Die Kontrastierung führt dazu, dass die Nanopartikel im TEM-Bild weiß und die Zwischenräume schwarz erscheinen.

4.2.5 Proteinquantifizierung

Eine quantitative Bestimmung von Proteinen kann mit Hilfe unterschiedlicher Methoden erfolgen. Die Auswahl einer geeigneten Methode hängt unter anderem von der Art und Konzentration des Proteins und der das Protein umgebenden Matrix bzw. dem Lösungsmittel ab. Häufig angewendet wird die Methode nach Biuret (Kingsley, 1939), bei der Peptidbindungen mit zweiwertigen Kupferionen in alkalischer Umgebung einen violetten Komplex bilden. Eine Weiterentwicklung der Biuret-Methode ist die Methode nach Lowry (Lowry et al., 1951). Bei dieser Methode schließt sich der Biuretreaktion noch eine weitere Farbreaktion an, bei der das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz (Folin und Ciocalteu, 1927) (Lösung aus Phosphomolybdat und Phosphowolframat) vermutlich durch den Kupfer-Protein-Komplex reduziert wird und sich dunkelblau verfärbt. Durch die zweite Farbreaktion wird die Empfindlichkeit dieser Methode deutlich erhöht. Neben den Kupfer-basierten Quantifizierungsmethoden gibt es auch Farbstoff-basierte Methoden, wie zum Beispiel den Bradford Assay (Bradford, 1976). Bei dieser Methode bilden die unpolaren Bereiche des Proteins im Sauren Komplexe mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blau G 250. Durch die Komplexbildung wird die rote kationische Form des Farbstoff in die blaue anionische Form überführt und stabilisiert. Die Intensität der Färbung ist bei allen genannten Farbreaktionen der Proteinmenge proportional und kann mittels Absorptionsmessung ermittelt werden.

In dieser Arbeit wurde der BCA Assay, der den Kupfer-basierten Methoden zuzuordnen ist, und die UV/Vis Spektroskopie verwendet, um Proteinmengen zu quantifizieren.

4.2.5.1 Bicinchoninsäure-Assay

Der Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) wird häufig in der Proteinanalytik eingesetzt, da er eine hohe Empfindlichkeit aufweist, einfach durchzuführen ist und, im Gegensatz zur Lowry-Methode, eine große Toleranz gegenüber störenden Substanzen, wie zum Beispiel Puffersalzen und Detergenzien, zeigt (Schoel et al., 1995). Die Probe wird mit Kupfersulfatlösung, Natronlauge und Bicinchoninsäure (BCA) versetzt und inkubiert. Analog zur Biuretreaktion bildet sich ein Kupfer-Protein-Komplex und innerhalb des Komplexes werden die zweiwertigen Kupferionen zum einen durch Cystein-, Tryptophan- und Tyrosinreste des Proteins und zum anderen durch Peptidbindungen zu einwertigen Kupferionen reduziert (Smith et al., 1985). Bicinchoninsäure zeigt eine hohe Spezifität für einwertige Kupferionen und bildet mit diesen einen stabilen violetten Komplex (siehe Abbildung 4.5) mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.

In dieser Arbeit wurde ein Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) mit einem Nachweisbereich von 2-40 µg/ml verwendet. Die Bestimmungen wurden analog des Protokolls für Mikrotiterplatten durchgeführt. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 570 nm mit Hilfe eines Plattenlesegerätes (Tecan Spectra Thermo, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand einer Kalibrierkurve, welche mit Standardlösungen des jeweils verwendeten Proteins erstellt wurde.

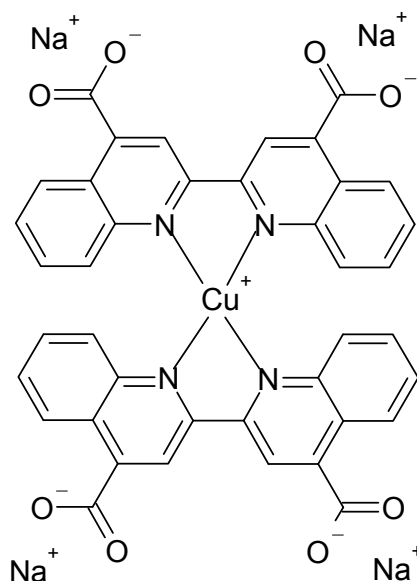


Abbildung 4.5: Darstellung des Komplexes aus einwertigen Kupferionen und Bicinchoninsäure

4.2.5.2 UV/Vis Spektroskopie

Die Bestimmung des Proteingehaltes einer Lösung ist auch über direkte Absorptionsmessung mittels UV/Vis Spektroskopie möglich (Aitken und Learmonth, 1996). Bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren hauptsächlich die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan. Daher führt diese Methode bei Proteinen, die besonders arm oder reich an diesen Aminosäuren sind, zu Fehleinschätzungen des Proteingehalts. Werden die Messungen dagegen im fernen UV-Bereich durchgeführt, absorbieren hauptsächlich die Peptidbindungen, aber auch Aminosäuren der Proteinseitenketten wie beispielsweise Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin, Histidin, Cystein und Arginin. Das Absorptionsmaximum der Peptidbindungen liegt etwa bei 190 nm, allerdings kann es in diesem Wellenlängenbereich auch zu einer Absorption durch Sauerstoff kommen. Um dies zu vermeiden, werden Messungen im fernen UV-Bereich häufig bei 205 nm durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden die Absorptionen der Proteinlösungen mittels eines Lambda 40 Spektrophotometers (Perkin Elmer, Waltham/Massachusetts, USA) bei einer Wellenlänge von 230 nm gemessen, da bei dieser Wellenlänge ein geeignetes Verhältnis von Konzentration der Proben zu Absorption vorlag. Der Proteingehalt wurde dann mit einer mit Hilfe von Proteinstandardslösungen hergestellten Kalibriergerade berechnet.

4.2.6 Gelelektrophorese

Die Bestimmung von Molekulargewichten von Proteinen kann mittels SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) erfolgen. Durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat wird die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins zerstört und die Proteineigenladung überdeckt. Außerdem werden durch Zugabe von reduzierenden Thiolen die Disulfidbrücken des Proteins gespalten. Insgesamt führt die Probenvorbereitung dazu, dass das Protein in linearisierter, aufgefalteter Form vorliegt und eine konstant negative Ladung trägt. Zur Auftrennung werden die Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgebracht, welches sich in einer Elektrolytlösung befindet, und anschließend wird eine elektrische Spannung angelegt. Die Proteinmoleküle migrieren zur Kathode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur Größe des Moleküls ist: große Moleküle werden stärker zurückgehalten als kleine und bewegen sich daher langsamer durch das Gel. Nach erfolgter Auftrennung werden die Proteinbanden zum Beispiel durch Anfärbungen sichtbar gemacht und können mit einem Marker aus Proteinen bekannter Größe zur Bestimmung des Molekulargewichts verglichen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Laemmli, 1970) angewendet, um eine bestmögliche Auftrennung der Proteine zu gewährleisten. Dazu durchliefen die Proben

zunächst ein 6%iges, pH-neutrales Sammelgel und wurden aufkonzentriert, bevor die Auftrennung mit Hilfe eines 10%igen Trenngels mit alkalischem pH-Wert erfolgte. Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde ein Mini Protean Tetra Cell System (BIO-RAD Laboratories Inc., USA) mit selbstgegossenen Gelen der Größe 90x70x1 mm verwendet. Die gelösten Proben wurden mit Ladepuffer, der SDS und β -Mercaptoethanol enthielt, versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Nach Beladung des Gels mit den vorbereiteten Proben (10 μ l je Reihe; entsprechend 4 μ g BSA beziehungsweise 6 μ g OVA), wurde die Elektrophorese zunächst mit einer Spannung von 120 V gestartet und dann mit 200 V fortgeführt. Als Referenz wurden das jeweilige reine Protein und ein Molekulargewichtsmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) verwendet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele zur Visualisierung der Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blau G 250 gefärbt und anschließend fotografiert.

4.2.7 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Das Verfahren der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) findet unter anderem Anwendung in der Bestimmung der Sekundärstruktur beziehungsweise Konformation von Proteinen und anderen Biopolymeren. Bei der Messung wird die Absorption von zirkular polarisiertem Licht durch die Probe in Abhängigkeit von der Wellenlänge bestimmt. Zirkular polarisiertes Licht schwingt, genauso wie linear polarisiertes Licht, nur in einer Ebene. Allerdings beschreibt die Schwingungsrichtung bei der Ausbreitung eine Spirale. Linkszirkular polarisiertes Licht dreht dabei entgegen dem Uhrzeigersinn, rechtszirkular polarisiertes Licht mit dem Uhrzeigersinn. Weisen links- und rechtszirkular polarisiertes Licht die gleiche Frequenz, Amplitude und Phase auf, das heißt, wenn sie kohärent sind, dann ergeben sie linear polarisiertes Licht.

Trifft zirkular polarisiertes Licht auf eine Proteinprobe, dann kommt es zu unterschiedlichen Wechselwirkungen der beiden Polarisierungsarten mit den Proteinmolekülen, was zu einer Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit und Absorption führen kann. Werden links- und rechtszirkular polarisiertes Licht in unterschiedlichem Ausmaß durch die Probe absorbiert, dann besitzt das resultierende Licht eine elliptische Polarisation (siehe Abbildung 4.6), da beide Strahlungsarten sich in ihrer Amplitude unterscheiden (Rücker et al., 2001).

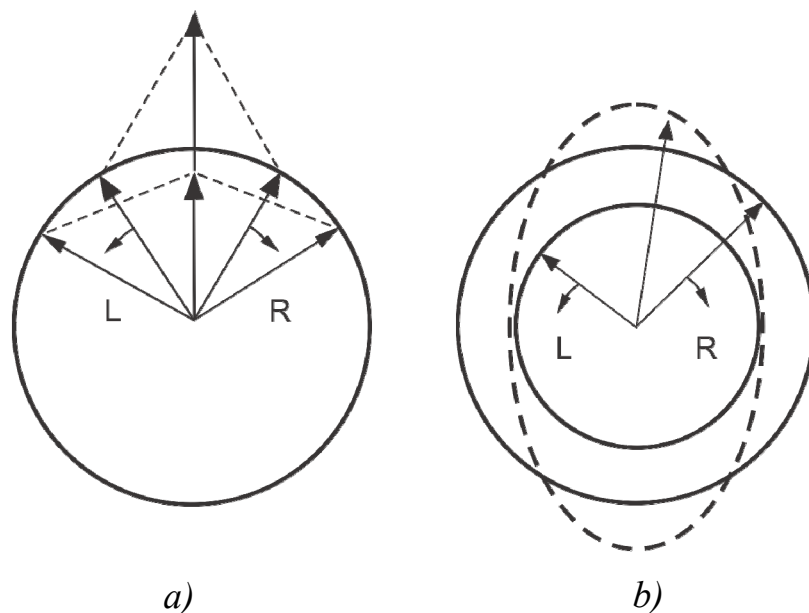


Abbildung 4.6: a) links- und rechtspolarisiertes Licht als Komponenten von linear polarisiertem Licht; b) elliptisch polarisiertes Licht infolge einer stärkeren Absorption von rechtspolarisiertem Licht; Abbildung modifiziert nach Kelly, Jess und Price (2005)

Bei der CD-Spektroskopie wird dieser Unterschied in der Absorption der beiden Strahlungsarten in Abhängigkeit von der Wellenlänge gemessen. Dabei ist die Differenz ΔA der Absorption des links- und rechtszirkular polarisierten Lichtes (A_L , A_R) definiert als Zirkulardichroismus (Rücker et al., 2001).

$$\Delta A = A_L - A_R \quad (4.1)$$

Häufig wird anstelle des Absorptionsunterschiedes der beiden Strahlungsarten auch die Elliptizität θ , welche dem Zirkulardichroismus entspricht, angegeben. Die CD-Messungen werden im fernen UV-Bereich, das heißt in einem Wellenlängenbereich von etwa 180-240 nm, durchgeführt. Proteine zeigen eine Absorption im Bereich kleiner 240 nm, welches der Absorption durch Peptidbindungen entspricht, und im Bereich von 260-320 nm, welches auf die Absorption durch aromatische Aminosäuren der Seitenketten zurückzuführen ist (Kelly et al., 2005). Wird nach einer Messung die Elliptizität θ gegen die Wellenlänge aufgetragen, so erhält man ein CD-Spektrum, welches charakteristisch für das jeweilige Protein ist und Aufschluss über dessen Sekundärstruktur gibt. Abbildung 4.7 zeigt die CD-Spektren unterschiedlicher Sekundärstrukturen (α -Helix, β -Faltblatt, ungeordnet).

In dieser Arbeit wurde zur Bestimmung der Sekundärstruktur der Proteine ein J-720 Spektropolarimeter (Jasco, Easton/Maryland, USA) verwendet. Die CD-Messungen wurden in einer Quarzglasküvette ($d = 0,05$ cm) bei Raumtemperatur und in einem Wellenlängenbereich von 200-250 nm durchgeführt. Bei chitosanhaltigen Formulierungen wurde das Polymer vor jeder Messung durch Ausfällung und anschließende Zentrifugation (15 min bei 6000 g) entfernt. Die nanopartikulären Formulierungen wurden zur Abtrennung der Partikel zentrifugiert (5 min bei 14000 g). Die Proteinmenge der Proben betrug 0,25 mg/ml. Alle Spektren wurden um die Basislinie und den Leerwert des Lösungsmittels korrigiert und zeigen den Mittelwert von zwei Messungen.

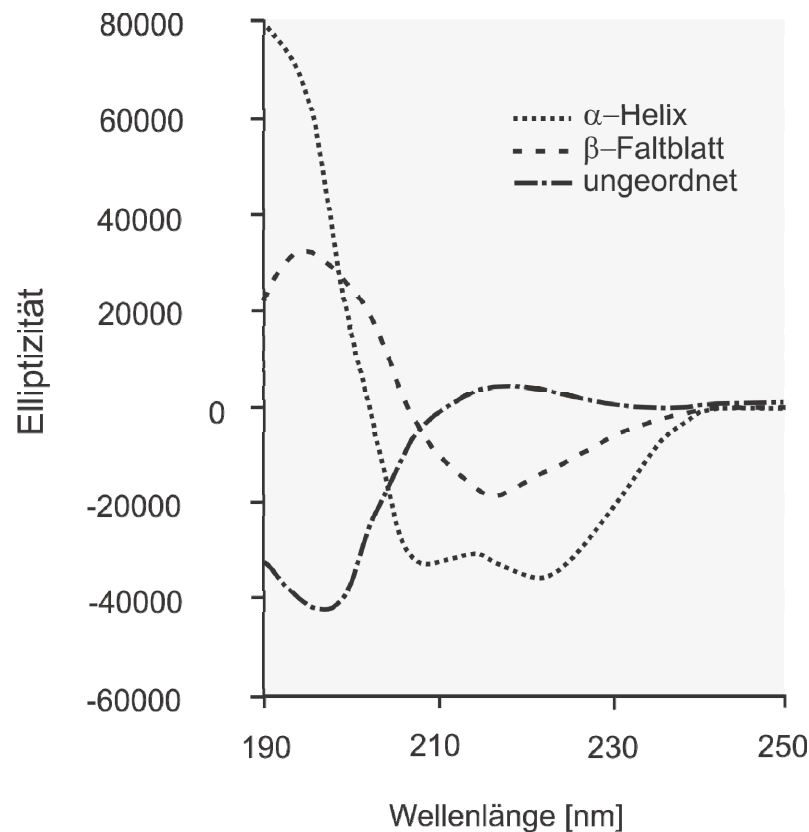


Abbildung 4.7: CD-Spektren unterschiedlicher Proteinsekundärstrukturen (modifiziert nach Alliance Protein Laboratories Inc.)

4.2.8 Freisetzungsuntersuchungen

Wie bereits in Kapitel 2.3 beschrieben, dienen partikuläre Vakzinformulierungen unter anderem dazu neben einer systemischen auch eine lokale Immunantwort hervorzurufen. Dafür muss das Antigen partikulär vorliegen und im Ganzen von Immunzellen aufgenommen werden. Daher sollte das Antigen erst nach Aufnahme der Formulierung durch Immunzellen aus dieser freigesetzt werden. Um das Auflösungsbeziehungsweise Freisetzungsverhalten der nano- und mikropartikulären Formulierungen zu bestimmen, wurden Freisetzungsuntersuchungen durchgeführt.

Für diese in-vitro Freisetzungsuntersuchungen wurden zwei Freisetzungsmedien und Temperaturen gewählt. Einerseits wurde künstliche Nasalflüssigkeit pH 6,4 (simulated nasal fluid, SNF) bei 34°C eingesetzt, um die physiologischen Bedingungen in der Nasalkavität zu

imitieren (Callens et al., 2003; Elad et al., 2008; Washington et al., 2000). Andererseits wurde Phosphatpuffer pH 5,5 (Ph. Eur., 2012) bei 37°C verwendet, um die physiologischen Bedingungen innerhalb des Endosoms in der Zelle nachzuahmen (Geisow und Evans, 1984). Die Zusammensetzung des SNF ist in Tabelle 4.1 dargestellt. Für die Untersuchung wurden die Formulierungen (100 mg der Mikropartikel aus Chitosan beziehungsweise 300 mg der nanopartikulären Formulierung) in dem jeweiligen Freisetzungsmedium (10 ml) dispergiert und unter Bewegung in einem Schüttelwasserbad (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland) bei 100 rpm inkubiert. Über einen Zeitraum von vier Stunden wurden Proben (300 µl) gezogen und das entnommene Volumen wurde durch frisches Freisetzungsmedium ersetzt. Die Proben wurden zentrifugiert und das freigesetzte Protein im Überstand mittels UV/Vis Spektroskopie (siehe Abschnitt 4.2.5.2) quantifiziert. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung der künstlichen Nasalflüssigkeit (SNF)

Komponente	Konzentration
NaCl	7,45 mg/ml
KCl	1,29 mg/ml
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,32 mg/ml
Aqua bidestillata	q.s.

4.3 Statistische Methoden

4.3.1 Deskriptive Statistik

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden verschiedene Methoden der beschreibenden Statistik verwendet. Die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung mehrerer Einzelmessungen erfolgte nach

Gleichung (4.2) und (4.3). Bei der graphischen Darstellung von Mittelwerten wurde entweder die Standardabweichung beziehungsweise die relative Standardabweichung (Gleichung (4.4)) oder die beidseitige Abweichung vom Mittelwert, berechnet nach Gleichung (4.5) und (4.6), als Fehlerbalken eingezeichnet.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (4.2)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (4.3)$$

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (4.4)$$

$$\text{Abweichung max} = \text{Maximalwert} - \bar{x} \quad (4.5)$$

$$\text{Abweichung min} = \bar{x} - \text{Minimalwert} \quad (4.6)$$

Der ungepaarte t-Test nach Student wurde in einigen Fällen zum Vergleich unterschiedlicher Mittelwerte herangezogen, um zu prüfen, ob die Mittelwerte sich signifikant unterscheiden. Voraussetzung für den t-Test ist die Annahme der Nullhypothese im F-Test. Dadurch wird bestätigt, dass sich die Varianzen der Mittelwerte nicht signifikant voneinander unterscheiden. Die Prüfungen wurde mit Hilfe der Statistikfunktionen der Software Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) durchgeführt.

Zur Evaluierung der Vergleichbarkeit beziehungsweise der Reproduzierbarkeit der Depositionsuntersuchungen wurde der

Ähnlichkeitsfaktor für die Deposition im Nasenvorhof, in den Nasenmuscheln und im Nasopharynx anhand einer modifizierten f_2 -Statistik (Emea, 2010) nach Gleichung (4.7) berechnet. Ein Ähnlichkeitsfaktor zwischen 50 und 100 gibt an, dass die Einzelmessungen einer Dreifachbestimmung untereinander vergleichbar sind.

$$f_2 = 50 \times \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum [\bar{R} - \bar{T}]^2}{n}}} \right]$$

f_2 Ähnlichkeitsfaktor (4.7)

n Anzahl der Segmente des
Nasenmodells

\bar{R}, \bar{T} Kumulative Deposition in
% in den vier Segmenten

4.3.2 Statistische Versuchsplanung

Für die Erstellung und Auswertung von statistischen Versuchsplänen wurde die Software DesignExpert (Version 7.1, Stat-Ease Inc., Minneapolis/Minnesota, USA) verwendet. Es wurde ein vollfaktorielles Design ausgewählt und für die Auswertung eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ angenommen.

Praktischer Teil

5 Mikropartikuläre Formulierungen

5.1 Einleitung

Mikropartikel werden in der Literatur häufig als Trägersysteme für die mukosale Vakzinierung beschrieben, da sie deutliche Vorteile gegenüber konventionellen Formulierungen wie zum Beispiel Lösungen aufweisen. Zum einen können Partikel mit Durchmessern zwischen 1-5 μm von Makrophagen und M-Zellen aufgenommen werden (Bhavsar und Amiji, 2007), was den Transport über die Zellmembran beziehungsweise Mukosa erleichtert und zudem effektiv die Immunogenität des Impfstoffs erhöht. Zum anderen können Mikropartikel im Vergleich zu Lösungen die Verweilzeit des Impfstoffs auf der Mukosa erhöhen, was zu einer gesteigerten Aufnahme des Antigens führt (Kang et al., 2009). Dieser Effekt wird durch den Einsatz von mukoadhäsiven Polymeren wie zum Beispiel Chitosan oder Alginat noch verstärkt. Für die Herstellung von mikropartikulären Formulierungen werden überwiegend bioabbaubare und biokompatible Polymere eingesetzt. Das am häufigsten verwendete Polymer ist dabei Polylactid-co-glykolid (PLGA) (Mestecky et al., 1997), aber auch Chitosan wird häufig genutzt. Chitosan-Mikropartikel wurden in der Literatur mehrfach für die nasale Applikation von Proteinen, Peptiden und Impfstoffen beschrieben (Alpar et al., 2005; Kang et al., 2006; van der Lubben et al., 2003; Varshosaz et al., 2004). Die Herstellung erfolgte dabei entweder durch Sprühtrocknung oder durch Präzipitation beziehungsweise Koazervation mit negativ geladenen Ionen wie Tripolyphosphat oder Natriumsulfat.

In dieser Arbeit wurden BSA-beladene Chitosan-Mikropartikel mittels Sprühtrocknung hergestellt und anschließend charakterisiert. Die Charakterisierung umfasste physikochemische Eigenschaften der Partikel wie die Partikelgröße und Morphologie, das Dispergierverhalten mit Hilfe nasaler Applikationshilfen sowie die nasale Deposition. Zusätzlich wurde die Stabilität des verwendeten Modellantigens in der Formulierung untersucht.

5.2 Chitosan-Mikropartikel

5.2.1 Herstellung durch Sprühtrocknung

Die Herstellung der Mikropartikel erfolgte durch Sprühtrocknung einer Lösung aus Chitosan und BSA. Dafür wurden Chitosan (1% m/m) und BSA (0,3% m/m) in 0,01 N Salzsäure (HCl) pH 2,6 gelöst und sprühgetrocknet. Da BSA oberhalb einer Temperatur von 60°C denaturiert (siehe Abschnitt 3.1.1), wurde die Auslasstemperatur im Bereich von 53-55°C gewählt.

Die Parameter zur Sprühtrocknung der Chitosan-Mikropartikel wurden zunächst empirisch definiert. Um den Einfluss der Prozessparameter auf die Produkteigenschaften beurteilen zu können, wurde daraufhin ein statistischer Versuchsplan erstellt. Als Zielgrößen wurden die mittlere Partikelgröße (x_{50}), die Ausbeute und die Restfeuchte des erhaltenen sprühgetrockneten Produkts definiert. Die evaluierten Faktoren (Einflussgrößen) umfassten die Aspiratorleistung, die Sprütrate des Produkts und die Sprühlufrate der Düse. Die Einstellungen sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Der Durchmesser der Düse wurde nicht variiert und betrug 1,2 mm. Die Einlasstemperatur wurde bei den jeweiligen Versuchen so gewählt, dass eine Auslasstemperatur von 55°C nicht überschritten wurde. Der Versuchsplan war vollständig faktoriell und beinhaltete vier

Zentralpunkte, zwei Faktorstufen („niedrig“, „hoch“) und zwei Wiederholungsmessungen.

Tabelle 5.1: Einstellungen der Faktoren des statistischen Versuchsplans

Parameter	Einstellungen	
	„niedrig“	„hoch“
Aspirator	80%	100%
Sprührate Produkt	5% \pm 1,5 ml/min	17% \pm 5 ml/min
Sprühlufrate Düse	36 mm \pm 410 l/h	52 mm \pm 670 l/h

Für die Erstellung und Auswertung des Versuchsplans wurde die Software DesignExpert (Version 7.1, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) verwendet. Die Auswertung ergab, dass nur der Einfluss der Sprühlufrate der Düse auf die Partikelgröße signifikant ist (Signifikanz des Modells $p < 0,0001$). Abbildung 5.1 zeigt, dass mit zunehmender Sprühlufrate die mittlere Partikelgröße sinkt, wobei die Aspiratorleistung darauf keinen Einfluss hat. Durch Erhöhung der Sprühlufrate der Düse wird der Flüssigkeitsfilm in kleinere Tröpfchen zerteilt, was kleinere Partikel zur Folge hat. Allerdings ist der Bereich, in dem die Partikelgrößen variiert werden können, sehr eng. Bei diesen Versuchen lag die mittlere Partikelgröße bei „hoher“ Einstellung der Sprühlufrate bei 1,8 μm und bei „niedriger“ Einstellung bei 2,5 μm . Anders als bei der Partikelgröße haben die Änderungen der Prozessparameter keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbeute und die Restfeuchte des sprühgetrockneten Produkts.

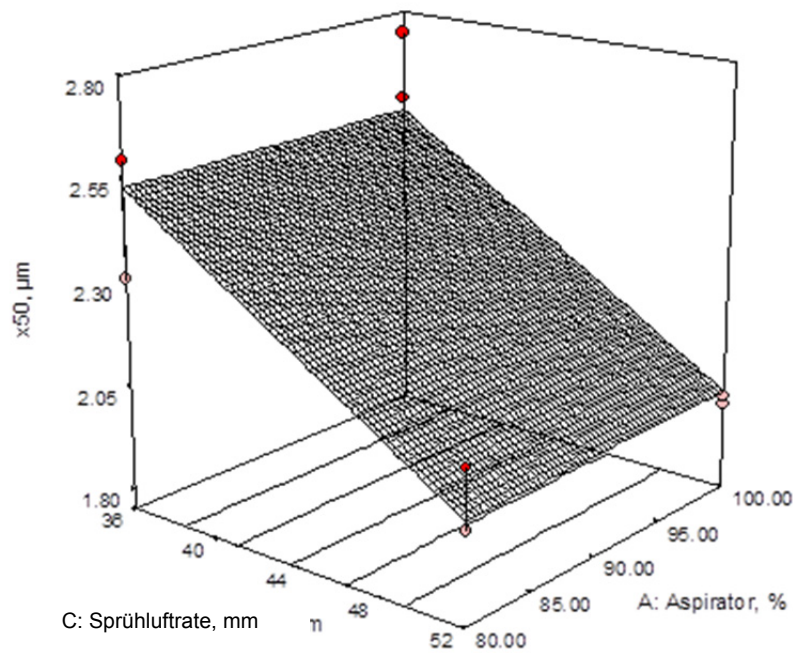


Abbildung 5.1: Einfluss der Sprühlufrate der Düse und der Aspiratorleistung auf die Partikelgröße (x_{50}) bei einer konstanten Pumprate von 11%

Die Partikelgröße der Mikropartikel beeinflusst die Effizienz und Effektivität der Formulierung. Um eine Aufnahme durch M-Zellen des lymphatischen Gewebes in der Nase zu ermöglichen, sollten die Partikel möglichst klein sein. Eine überwiegend nasale Deposition wird dagegen häufig nur mit Partikeln $> 45 \mu\text{m}$ erreicht. Da durch die Sprühtrocknung der Chitosan-Lösung mit dem Büchi B-290 keine Partikelgrößen über $2,5 \mu\text{m}$ erreicht werden können und eine partikuläre Aufnahme durch Immunzellen essenziell für eine favorisierte lokale Immunantwort ist, wurde der Fokus auf die Herstellung möglichst kleiner Partikel gelegt. Für die weitere Herstellung der Chitosan-Mikropartikel wurden daher die in Tabelle 5.2 beschriebenen Sprühtrocknungsparameter verwendet.

Tabelle 5.2: Prozessparameter der Sprühtrocknung

Parameter	Einstellung
Zuluft-Temperatur	120°C
Abluft-Temperatur	53-55°C
Aspirator	35 m ³ /h \pm 100%
Sprühlufrate	670 l/h
Sprührate Produkt	5-8 ml/min

5.2.2 Physikochemische Charakterisierung der Mikropartikel

Die durch Sprühtrocknung erhaltenen Mikropartikel aus Chitosan und BSA wurden zunächst hinsichtlich der Morphologie, des Proteingehalts und der Partikelgröße charakterisiert.

Die Chitosan-Mikropartikel sind sphärisch und weisen eine glatte Oberfläche auf (siehe Abbildung 5.2). Diese Morphologie ist charakteristisch für sprühgetrocknete Produkte.

Der Proteingehalt der Mikropartikel wurde mittels BCA-Assay bestimmt und beträgt im Mittel 19,27% \pm 0,98% (m/m). Vor der Proteinquantifizierung wurden die Partikel gelöst und das Chitosan durch Präzipitation und anschließende Zentrifugation abgetrennt, da es sonst die Analytik stören würde. Im Vergleich zum theoretischen, das heißt berechneten Proteingehalt, der bei 23% liegt, weist der tatsächliche Gehalt eine Diskrepanz von etwa 4% auf. Dieser Verlust lässt sich unter anderem auf die notwendige Probenpräparation und die damit verbundene partielle Adsorption von BSA an die Oberflächen der verwendeten Gefäße sowie auf einen Mindergehalt des Ausgangsmaterials zurückführen.

Der Proteingehalt der Mikropartikel lässt sich im Allgemeinen variabel gestalten, so dass unterschiedliche Dosierungen gewährleistet werden

können. Es können sowohl Mikropartikel mit einem deutlich reduzierten als auch mit einem erhöhten Anteil an Antigen hergestellt werden. Allerdings sollte der überwiegende Anteil der Partikel aus Chitosan bestehen, um eine verlängerte Freisetzung des Antigens zu erreichen und um eine ausreichende Mukoadhäsivität der Formulierung auf der Nasalmukosa zu gewährleisten.

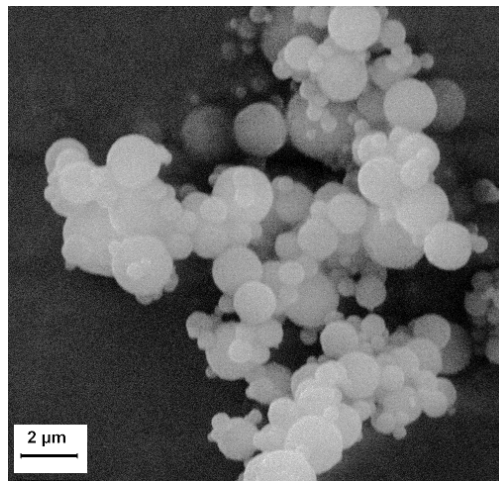


Abbildung 5.2: REM-Aufnahme der sprühgetrockneten Mikropartikel; 5000fache Vergrößerung

Die Partikelgrößenverteilungen der Mikropartikel wurden mittels Laserdiffraktometrie unter Verwendung des CUVETTE- und des SPRAYER-Moduls bestimmt und sind in Abbildung 5.3 dargestellt. Die Nassmessung in der Küvette diente dazu, die Primärpartikelgröße der Mikropartikel zu messen. Dafür wurden die Partikel in mittelkettigen Triglyceriden suspendiert. Die Suspension wurde anschließend mit Ultraschall behandelt, um eventuell vorhandene Agglomerate zu zerstören (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Die mittlere Partikelgröße (x_{50} -Wert) der Mikropartikel beträgt nach dieser Messung $2,7 \mu\text{m} \pm 0,03 \mu\text{m}$. Mit Hilfe des SPRAYER-Moduls wurde die Partikelgrößenverteilung der Mikropartikel unmittelbar nach Dispergierung durch den PowderJet bestimmt. Die Verteilung weist zwei

Maxima auf und ist damit bimodal. Daraus lässt sich ableiten, dass die Mikropartikel nicht vollständig durch den PowderJet dispergiert werden, sondern dass neben Primärpartikeln auch Agglomerate von Pulverpartikeln vorhanden sind.

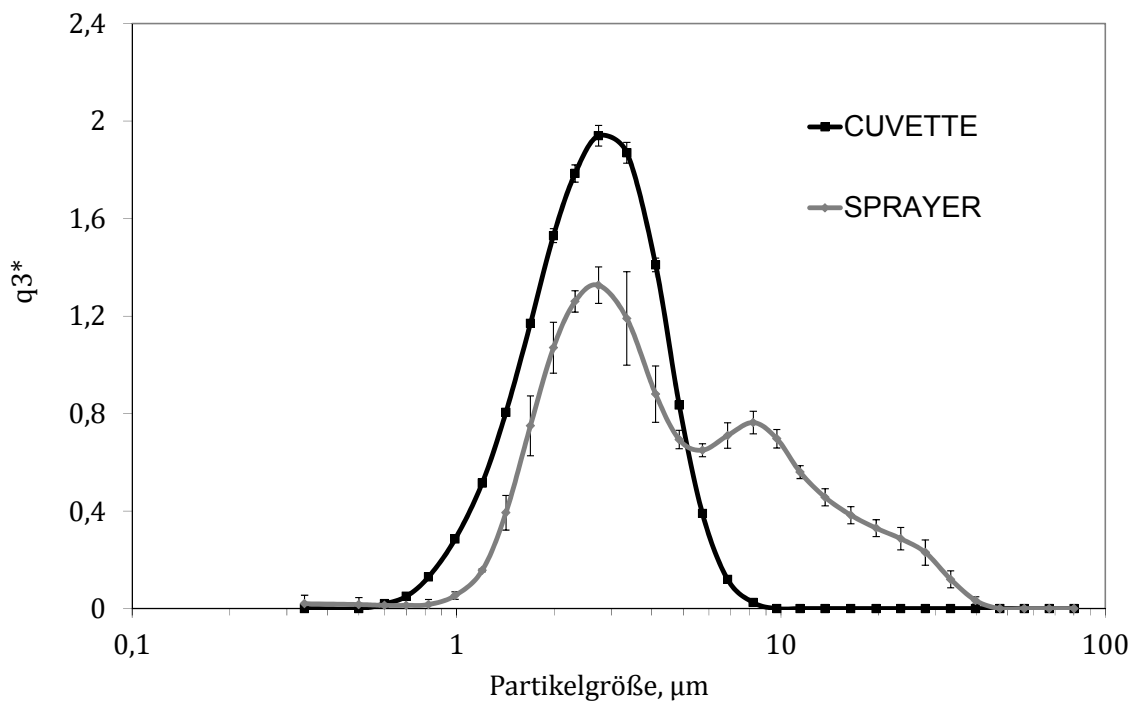


Abbildung 5.3: Partikelgrößenverteilungen der Chitosan-Mikropartikel gemessen mit HELOS-CUVETTE und HELOS-SPRAYER, $n=3$, Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung

5.2.3 Gleichförmigkeit der abgegebenen Masse

Durch Wägung der abgegebenen Einzelmassen wurde überprüft, ob der PowderJet eine gleichmäßige Dosierung der Chitosan-Mikropartikel gewährleistet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.4 dargestellt. Die mittlere abgegebene Dosis beträgt $2,15 \text{ mg} \pm 0,60 \text{ mg}$, allerdings ist die Dosierung durch den PowderJet nicht reproduzierbar. Die abgegebenen Massen schwanken stark um den Mittelwert und 12 von 30 Werten liegen außerhalb der Grenzen von $\pm 20\%$. Daher ist die Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis mit dieser Applikationshilfe nicht gewährleistet. Das

Pulver ist aufgrund der Partikelgröße im unteren Mikrometerbereich und einer Restfeuchte von 8% (bestimmt mittels Thermogravimetrie) kohäsiv und weist daher eine schlechte Fließfähigkeit auf. Daher sind die Einzeldosen, die durch die Dosierkammer der Applikationshilfe abgeteilt werden, ungleichmäßig. Mit zunehmender Anzahl an Auslösungen wird das Pulver im Reservoir verdichtet, so dass in diesem Fall nach 20 Sprühstößen nur noch eine geringe Masse dosiert und abgegeben wird.

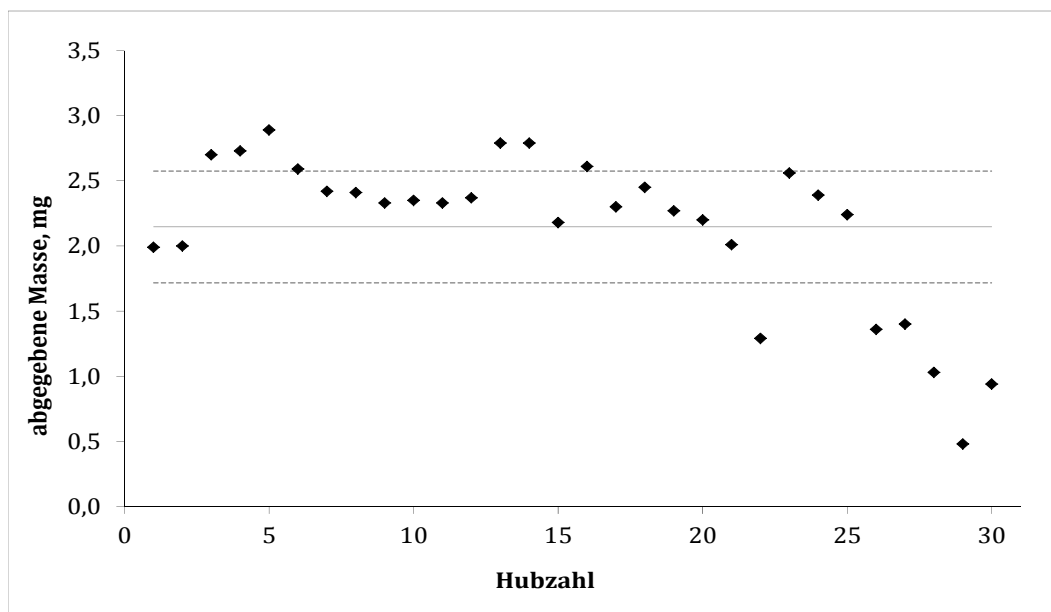


Abbildung 5.4: Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis; die gestrichelten Linien kennzeichnen die Grenzen von $\pm 20\%$ vom Mittelwert; die durchgezogene Linie gibt den Mittelwert an

Allerdings ist die Dispergierbarkeit einer Formulierung nicht nur von der Formulierung selbst, sondern auch von der verwendeten Applikationshilfe abhängig. In diesem Fall ist für eine gleichmäßige Dosierung der Mikropartikel der PowderJet weniger geeignet. Die Dosiergenauigkeit könnte aber durch die Wahl einer anderen Applikationshilfe verbessert werden.

5.2.4 Nasale Deposition

Die nasale Deposition der Chitosan-Mikropartikel wurde mit Hilfe des PowderJets, wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben bestimmt. Die Depositionsprofile sind in Abbildung 5.5 dargestellt.

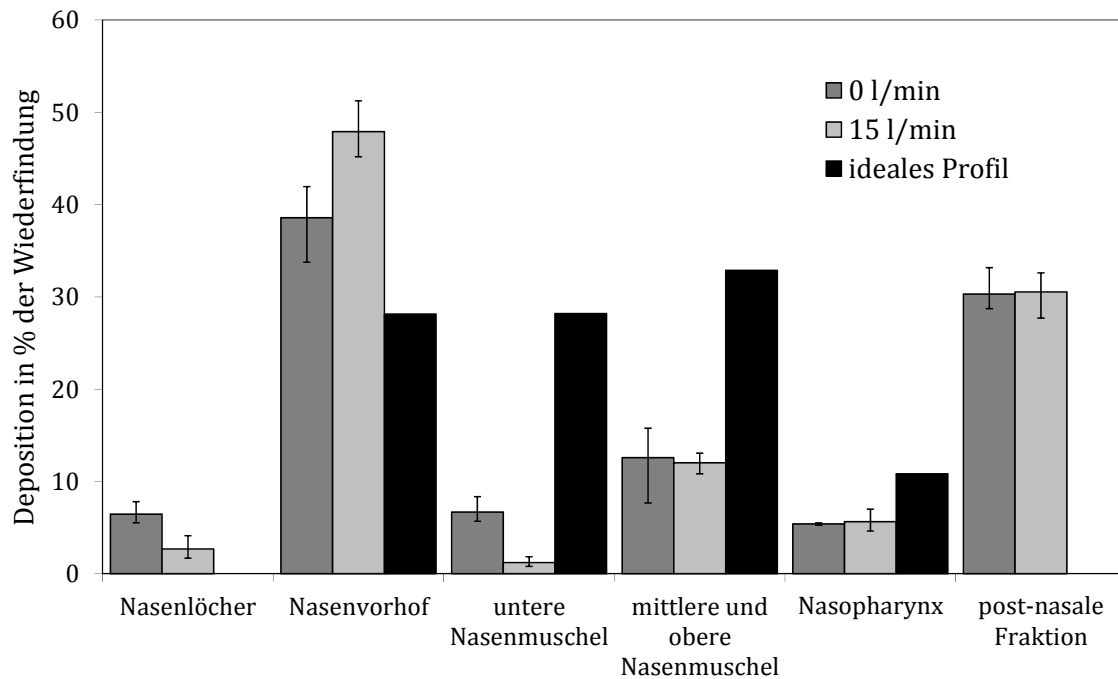


Abbildung 5.5: Depositionsprofile der sprühgetrockneten Chitosan-Mikropartikel bei 0 l/min und 15 l/min, Applikationshilfe PowderJet, n=3, Fehlerbalken kennzeichnen min-max

Die Depositionsprofile der Bestimmungen mit und ohne simuliertem Einatemstrom sind sich sehr ähnlich und weisen nur im Bereich des Nasenvorhofs deutliche Unterschiede auf. Die Bestimmung bei 0 l/min zeigt, dass fast 40% der Mikropartikel im Nasenvorhof abgeschieden wurden. Bei 15 l/min beträgt die Deposition in diesem Bereich sogar 48%. Im Vergleich zum idealen Profil weisen beide Depositionsprofile eine unzureichende Abscheidung der Mikropartikel in der Nasenkavität auf. Die abgeschiedene Proteinmenge im Nasenvorhof ist im Vergleich zum idealen Profil sehr hoch, allerdings fällt die Deposition in den hinteren Bereichen

des Nasenmodells, das heißt in den Nasenmuscheln und im Nasopharynx, deutlich zu gering aus. Die intranasale Deposition von nur 70% führt daher zu einer unerwünschten hohen post-nasalen Fraktion von 30%. Die Dispergierung der Mikropartikel durch den PowderJet führt dazu, dass sich eine schnell ausbreitende Sprühwolke aus Primärpartikeln und Pulveragglomeraten bildet, die schräg nach oben gerichtet ist. Daher wird ein großer Anteil der Partikel durch Impaktion im vorderen Teil der Nase abgeschieden. Die Partikel, die nicht schon in diesem Bereich impaktiert sind, können aufgrund ihrer geringen Partikelgröße die Nase passieren (siehe Abschnitt 2.1.2), was zu einer hohen post-nasalen Fraktion führt. Neben der Funktionsweise der Applikationshilfe trägt auch das Vorhandensein von Agglomeraten zu einer vergleichsweise hohen Deposition im Nasenvorhof bei. Der Nasenvorhof stellt den engsten Teil der Nase dar und daher werden größere Partikel aufgrund ihrer Trägheit überwiegend in diesem Bereich abgeschieden.

Der Vergleich mit dem idealen Profil zeigt deutlich, dass die nasale Deposition der Mikropartikel unzureichend ist und daher verbessert werden muss.

5.2.5 Freisetzungsuntersuchungen

Die Freisetzung des Modellantigens aus den Mikropartikeln wurde wie in Abschnitt 4.2.8 beschrieben bestimmt. Als FreisetzungsmEDIUM wurde künstliche Nasalflüssigkeit (simulated nasal fluid, SNF) pH 6,4 gewählt und die Untersuchungen wurden bei 34°C durchgeführt. Das Freisetzungsprofil ist in Abbildung 5.6 dargestellt. Die Freisetzungsuntersuchungen in SNF bei 34°C zeigen, dass das BSA nur langsam aus den Chitosan-Mikropartikeln freigesetzt wurde beziehungsweise dass die Mikropartikel sich nur langsam auflösen. Nach 60 min liegen erst etwa 30% gelöst im FreisetzungsmEDIUM vor. Da das Protein verteilt in einer Matrix aus Chitosan vorliegt, wurde

zunächst nur das an der Oberfläche befindliche, leicht zugängliche BSA freigesetzt. Daraus resultiert der schnelle Anstieg der Proteinkonzentration in den ersten 10 min.

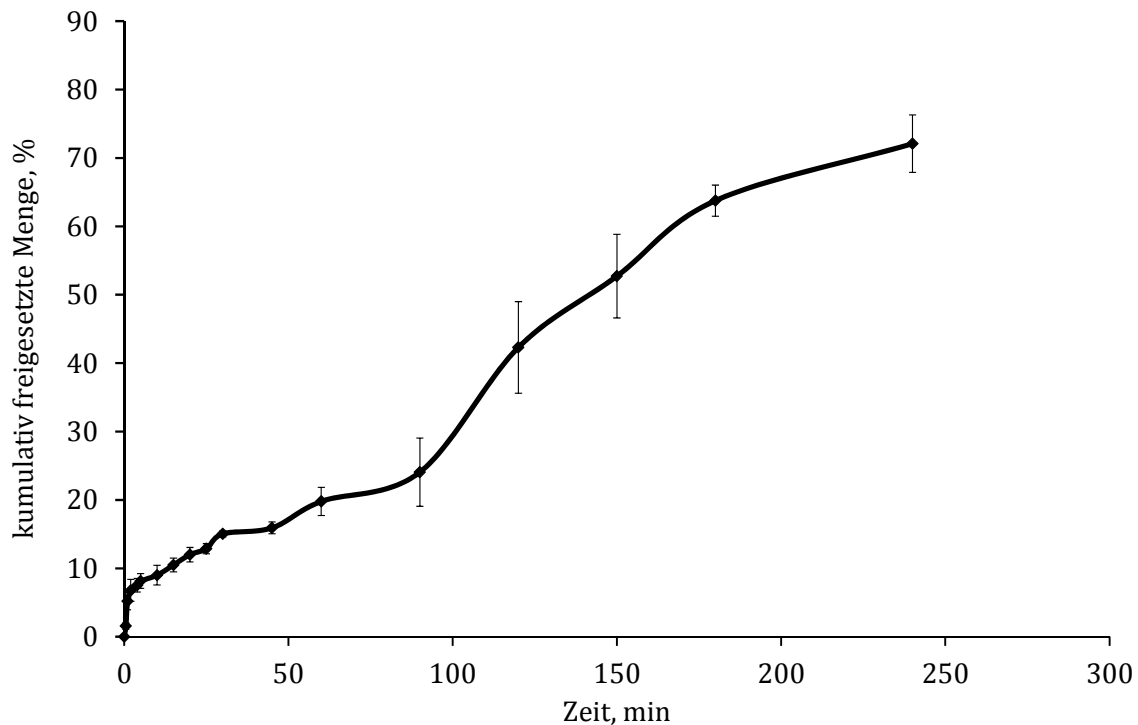


Abbildung 5.6: Freisetzungsprofil der Chitosan-Mikropartikel in künstlicher Nasalflüssigkeit (34°C, pH 6,4), n=3, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an

Im weiteren Verlauf der Freisetzung beginnen die Mikropartikel aufgrund der Hydrophilie des Polymers zu quellen und gehen in Hydrogelpartikel über. Das Quellungsverhalten von Chitosan ist unter anderem abhängig von dem Deacetylierungsgrad: je geringer der Deacetylierungsgrad desto größer ist das Quellungsvermögen (Ren et al., 2005). Aufgrund der hohen Viskosität der entstehenden Hydrogelmatrix kann die Diffusion des BSAs aus den Partikeln nur langsam erfolgen. Nach 100 min wird durch die beginnende Erosion der Matrix die Diffusionsstrecke verkürzt, was zu einer erhöhten Freisetzungsrates führt. Allerdings sind auch nach 4 h erst 70% des Antigens freigesetzt worden.

Da die Chitosan-Mikropartikel ganzheitlich von M-Zellen aufgenommen werden sollen, ist es vorteilhaft, wenn die Freisetzung des BSAs im Nasalfluid vergleichsweise langsam erfolgt. Denn ein möglichst großer Anteil des Antigens soll nach Aufnahme und Übergabe der Partikel an Immunzellen noch im Partikel zur Verfügung stehen, damit eine verstärkte lokale Immunantwort hervorgerufen werden kann. Das Freisetzungsprofil beziehungsweise das Auflöseverhalten der Mikropartikel entspricht diesen Anforderungen.

5.2.6 Proteinstabilität

Der Einfluss des Sprühtrocknungsprozesses auf die Stabilität des BSAs wurde mit Hilfe der SDS-PAGE und der CD-Spektroskopie untersucht (siehe Abschnitte 4.2.6 und 4.2.7). In Abbildung 5.7 sind die Ergebnisse der SDS-PAGE der BSA-beladenen Chitosan-Mikropartikel dargestellt.

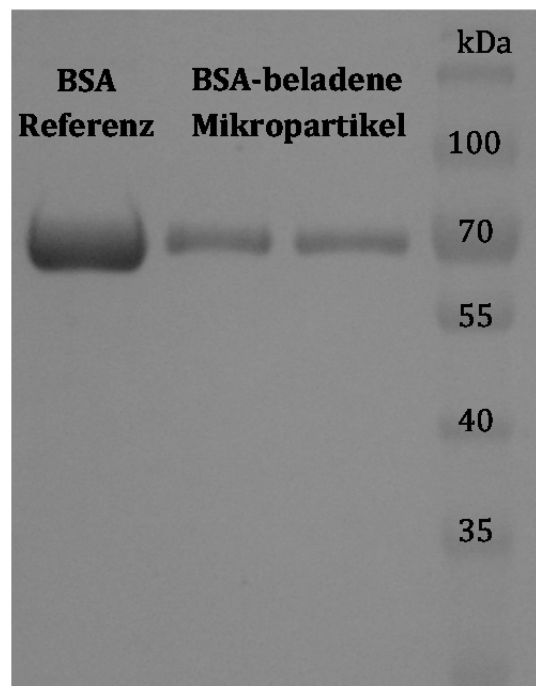


Abbildung 5.7: SDS-PAGE der BSA-beladenen Mikropartikel nach Sprühtrocknung

Im Gegensatz zur Primärstruktur wurde die Sekundärstruktur durch den Sprühtrocknungsprozess leicht verändert. Die CD-Spektren (siehe Abbildung 5.8) der BSA Referenz und der Probe sind nicht identisch, zeigen aber nur geringe Unterschiede.

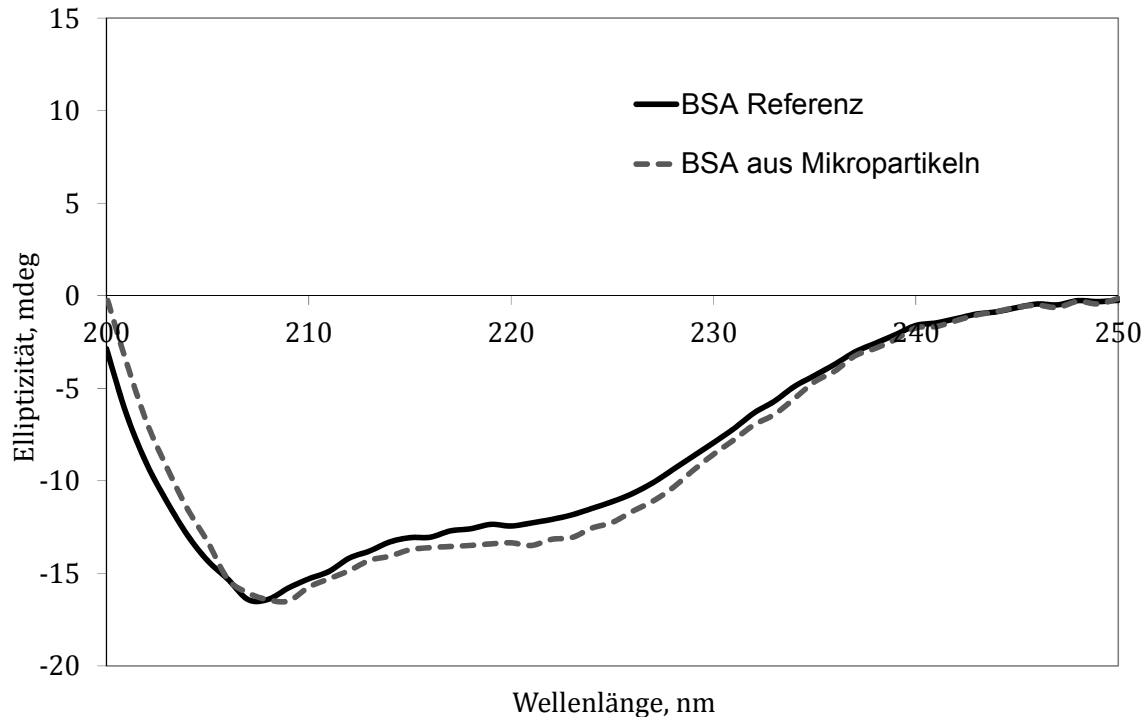


Abbildung 5.8: CD-Spektren von nativem BSA und BSA aus Chitosan-Mikropartikeln (Mittelwert aus zwei Bestimmungen)

Sowohl die BSA Referenz als auch das Protein aus der Probe weisen eindeutig eine α -helikale Struktur auf. Das heißt, durch den Herstellungsprozess ist es nicht zu einer dauerhaften Auffaltung und damit Denaturierung des Proteins gekommen. Es kann daher angenommen werden, dass auch die antigenen Eigenschaften des Proteins nicht verändert worden sind. Mit den Methoden der SDS-PAGE und der CD-Spektroskopie können allerdings nur Proteine im gelösten Zustand und nicht die Struktur des Proteins in den Partikeln untersucht werden. Daher lässt sich nicht eindeutig bestimmen, ob die Unterschiede in den CD-Spektren auf den Herstellungsprozess oder möglicherweise auf die Probenpräparation zurückzuführen sind.

5.2.7 Zusammenfassung

Chitosan-Mikropartikel mit eingebettetem BSA lassen sich einfach mittels Sprühtrocknung herstellen und zeigen eine geeignete mittlere Partikelgröße, die eine partikuläre Aufnahme durch M-Zellen ermöglichen sollte. Die Integrität des BSAs wird durch den Herstellungsprozess nicht verändert und die Sekundärstruktur zeigt im Vergleich zur Referenz einen geringfügig erniedrigten Anteil an α -Helix.

Die Freisetzungsuntersuchungen ergaben, dass das Antigen nur langsam aus den Mikropartikeln freigesetzt wird, was für die Effizienz der Formulierung von Vorteil ist.

Anhand der Depositionsuntersuchungen wurde gezeigt, dass fast ein Drittel der Mikropartikel nicht in der Nase abgeschieden werden, was zu einer unerwünscht hohen post-nasalen Fraktion führt. Außerdem lassen sich die Mikropartikel nicht reproduzierbar mit dem PowderJet dispergieren. Aufgrund der unzureichenden nasalen Deposition und der schlechten Dispergierbarkeit sind die Mikropartikel so nicht als Vakzinformulierung einsetzbar.

5.3 Interaktive Pulvermischungen

Die Chitosan-Mikropartikel sind zwar hinsichtlich ihrer Partikelgröße und ihres Freisetzungsverhaltens als Antigenträger geeignet, allerdings sind die nasale Deposition und die Dispergierbarkeit mit dem PowderJet unzureichend. Um diese Eigenschaften zu verbessern und eine finale Formulierung zu erhalten, wurden Pulvermischungen hergestellt.

Interaktive Pulvermischungen werden häufig in Trockenpulverinhalatoren (dry powder inhalers, DPIs) für die pulmonale Applikation von Wirkstoffen verwendet (Steckel, 2007). Damit Wirkstoffpartikel die Lunge erreichen können, sollten diese einen aerodynamischen Durchmesser von 1-5 μm

aufweisen. Allerdings sind Pulver, die eine Partikelgrößenverteilung im unteren Mikrometerbereich aufweisen, oft sehr kohäsiv. Die Primärpartikel neigen zur Bildung von Agglomeraten oder Aggregaten, was unter anderem in einer schlechten Fließfähigkeit und erschwerten Redispergierung zu Einzelpartikeln resultiert. Mikronisierte Wirkstoffe werden daher häufig mit Trägerstoffen wie zum Beispiel Laktose gemischt, wodurch diese an der Oberfläche der Trägerpartikel adhäreren (Steckel, 2007; Egermann, 1991). Während der Inhalation lösen sich die Wirkstoffpartikel vom Träger und können die Lunge erreichen, während die Trägerpartikel aufgrund ihrer Trägheit schon im Mund- und Rachenraum impaktieren. Durch die interaktive Pulvermischung wird die Aggregation der Wirkstoffpartikel reduziert und die Dispergierung erleichtert. Die Stärke der adhäsiven Kräfte zwischen Wirkstoff- und Trägerpartikeln und damit die Dispergierbarkeit der Partikel wird durch viele Faktoren beeinflusst. Dazu gehören unter anderem die Partikelgröße und -dichte, der Formfaktor der Partikel, die Oberflächenmorphologie, die Oberflächenenergie und die Hygroskopizität der eingesetzten Stoffe (Chow et al., 2007). Die Adhäsionskräfte, die zwischen mikronisiertem Wirkstoff und den Trägerpartikeln wirken, lassen sich dabei auf vier Mechanismen zurückführen, die Telko und Hickey (2005) zusammengefasst haben: (I) mechanisches Ineinandergreifen der Partikel aufgrund von Oberflächenunebenheiten, (II) Kapillarkräfte bei Vorhandensein (auch nur geringer Mengen) von Wasser, (III) elektrostatische Kräfte und (IV) van-der-Waals-Kräfte. Bei interaktiven Pulvermischungen, die für die inhalative Gabe von Wirkstoffen verwendet werden, müssen diese adhäsiven Kräfte während der Inhalation überwunden werden, damit sich die Wirkstoffpartikel vom Träger lösen und eine ausreichende Wirkstoffmenge die Lunge erreichen kann. Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit Pulvermischungen aus den Chitosan-Mikropartikeln und unterschiedlichen

Trägerstoffen hergestellt, bei denen die Mikropartikel möglichst fest auf der Oberfläche der Trägerpartikel adhäriert sind. Die Trägerpartikel sollen zusammen mit den Mikropartikeln in der Nase abgeschieden werden, so dass es zu einer Reduzierung der post-nasalen Fraktion kommt, denn die Trägerpartikel werden aufgrund ihrer Größe und der damit verbundenen Trägheit effektiver in der Nase abgeschieden als sehr kleine Partikel. Nach der Deposition in der Nase sollen sich die Trägerpartikel im Mukus schnell auflösen und dadurch die Mikropartikel den Immunzellen als Einzelpartikel zur Verfügung gestellt werden.

Als Trägerstoff wird bei Pulvermischungen für die inhalative Gabe häufig Laktose verwendet. Allerdings sollte diese aufgrund ihrer reduzierenden Eigenschaften unter anderem nicht bei Proteinen und Peptiden eingesetzt werden, da es zu unerwünschten Wechselwirkungen kommen kann (Steckel und Bolzen, 2004). Daher wurden für die inhalative Gabe von empfindlichen Wirkstoffen bereits andere Trägerstoffe, vor allem Zuckeralkohole wie Mannitol, evaluiert (Steckel und Bolzen, 2004), die keine reduzierenden Eigenschaften haben. In der vorliegenden Arbeit wurden als Trägermaterialien daher drei unterschiedliche Zuckeralkohole verwendet: Mannitol, Sorbitol und Maltitol (siehe Abschnitt 3.3). Von den Trägermaterialien wurde jeweils eine Siebfraktion von 45-90 μm eingesetzt, da sich dieser Partikelgrößenbereich besonders für die nasale Anwendung eignet (Scherließ, 2011).

5.3.1 Herstellung der Pulvermischungen

Die Herstellung der Pulvermischungen erfolgte in 25 ml Kunststoffkruken mit einer Ansatzgröße von 2,0 g. Die Trägermaterialien wurden mit Hilfe eines Siebturmes fraktioniert und die Fraktion 45-90 μm wurde anschließend verwendet. Die Komponenten wurden im Sandwichverfahren eingewogen, das heißt es wurde zunächst ein Teil des

Trägermaterials vorgelegt, dann wurden die antigenhaltigen Mikropartikel eingewogen und zum Schluss die restliche Menge Trägermaterial dazugegeben. Die Kruke wurde in einer mit Schaumstoff ausgekleideten Mischdose platziert, in der Turbulamischer eingespannt und gemischt (siehe Kapitel 4.1.2). Auf diese Weise wurden Pulvermischungen hergestellt, die 2%, 5% oder 10% (m/m) der Mikropartikel enthielten. Für die Bestimmung der Homogenität wurden nach erfolgter Mischung jeweils fünf Proben von 50 mg gezogen und der Gehalt an BSA mittels BCA-Assay bestimmt. Die Mischungen wurden weiter verwendet, wenn die berechnete relative Standardabweichung (RSD) < 5% war. Eine homogene Mischung konnte für alle Kombinationen von Mikropartikeln und Trägermaterialien erzielt werden.

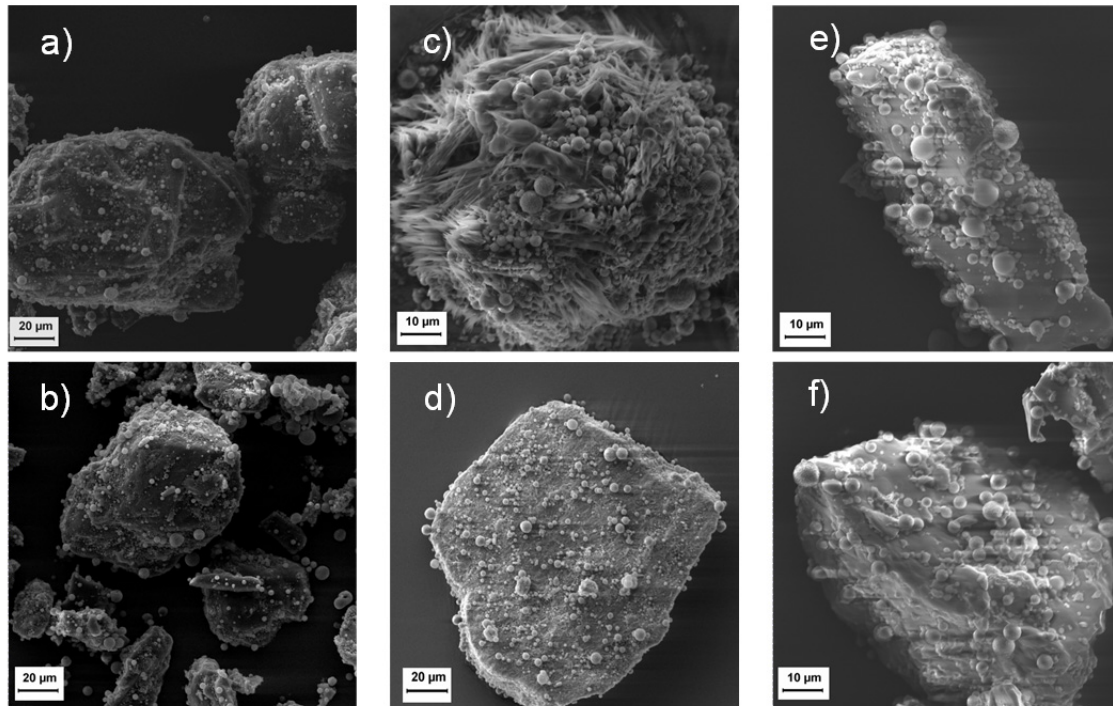
5.3.2 Physikochemische Charakterisierung der Trägermaterialien und Pulvermischungen

Die Trägermaterialien und Pulvermischungen wurden zunächst hinsichtlich der Partikel- und Oberflächenmorphologie und der Partikelgrößenverteilungen charakterisiert. Die Partikelgrößen der gesiebten Trägermaterialien wurden hierfür mittels HELOS-RODOS bestimmt, die der Pulvermischungen mit dem SPRAYER-Modul nach Dispergierung mit dem PowderJet. Die Morphologie wurde anhand von REM-Aufnahmen beurteilt.

In Abbildung 5.9 a-f sind die REM-Aufnahmen der Pulvermischungen mit einem Mikropartikelanteil von 5% dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die sphärischen Mikropartikel an den Trägerpartikeln adhärirt sind und fein verteilt auf der Partikeloberfläche vorliegen.

Die beiden Mannitolqualitäten (siehe Abbildung 5.9 a und b) zeigen sehr ähnliche Partikelmorphologien, obwohl sie aus unterschiedlichen Herstellungsprozessen hervorgehen. Während Pearlit 200 SD eine

sprühgranulierte Qualität darstellt, handelt es sich bei Pearlitol 160 C um eine kristallisierte, gemahlene Qualität. Die Partikel beider Qualitäten sind unregelmäßig geformt und weisen eine raue und unebene Oberflächenstruktur auf.



*Abbildung 5.9: REM-Aufnahmen der Pulvermischungen mit 5% Mikropartikel; a) Pearlitol 200 SD, b) Pearlitol 160 C, c) Neosorb P 100 T, d) C*PharmSorbidex, e) C*Maltidex, f) SweetPearl P 90*

Die Partikelgrößenverteilungen der gesiebten Trägermaterialien und der Pulvermischungen sind in Abbildung 5.10 (Pearlitol 200 SD) und Abbildung 5.11 (Pearlitol 160 C) dargestellt. Die Verteilungen der beiden Mannitol-Qualitäten sind annähernd identisch. Die mittlere Partikelgröße beträgt 54 µm (siehe Tabelle 5.3) und beide Trägermaterialien weisen trotz Siebung noch einen Feinanteil von Partikeln mit einer Größe < 45 µm auf. Im Vergleich der Trägermaterialien mit den jeweiligen Pulvermischungen zeigen sich jedoch Unterschiede.

Tabelle 5.3: Charakteristische Eigenschaften der Trägermaterialien

Trägermaterial	Zucker- alkohol	Form	Oberflächen- morphologie	x ₅₀ der Siebfraktion ± SD, µm
Pearlitol 200 SD	Mannitol	unregelmäßig	rau	53,9 ± 2,0
Pearlitol 160 C		unregelmäßig	rau	54,3 ± 1,8
Neosorb P 100 T	Sorbitol	sphärisch	stachelig	65,3 ± 2,9
C*PharmSorbidex		Plättchen	glatt	44,9 ± 4,3
C*Maltidex	Maltitol	oblong	glatt	77,8 ± 4,5
SweetPearl P 90		unregelmäßig	glatt	28,3 ± 0,8

Während sich die Partikelgrößenverteilungen von Pearlitol 200 SD und den Pulvermischungen nur wenig unterscheiden, zeigt sich für die Mischungen mit Pearlitol 160 C im Vergleich zum reinen Trägermaterial eine Verschiebung der Verteilungen zu kleineren Partikelgrößen. Dies ist vermutlich darin begründet, dass durch die Dispergierung mit dem PowderJet die Mikropartikel zum Teil von der Oberfläche der Trägerpartikel abgelöst werden und als Einzelpartikel beziehungsweise in kleineren Agglomeraten vorliegen.

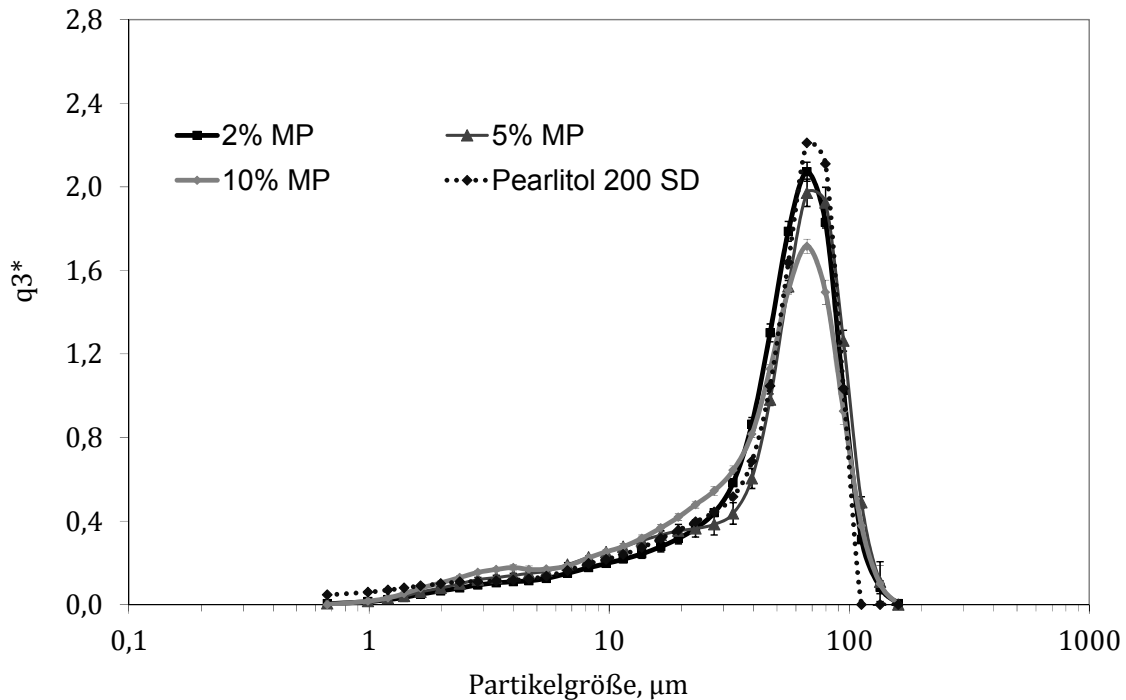


Abbildung 5.10: Partikelgrößenverteilungen der Pulvermischungen aus Pearlitol 200 SD und Mikropartikeln (HELOS-SPRAYER mit PowderJet) im Vergleich zum gesiebten Trägermaterial (HELOS-RODOS)

Im Vergleich der Partikelgrößenverteilungen der Pulvermischungen mit unterschiedlichen Anteilen an Mikropartikeln gibt es wenig Unterschiede, allerdings zeigt sich für die Mischungen mit Pearlitol 200 SD, dass mit steigendem Mikropartikelanteil auch der Feinanteil der Mischungen ansteigt. Besonders deutlich wird dies bei einem Mikropartikelanteil von 10%, denn je mehr Mikropartikel vorhanden sind desto stärker belegt ist die Oberfläche der Trägerpartikel und desto weniger stark sind die Mikropartikel adhäriert, was während des Dispergierens zu einer leichteren Ablösung dieser vom Träger führt.

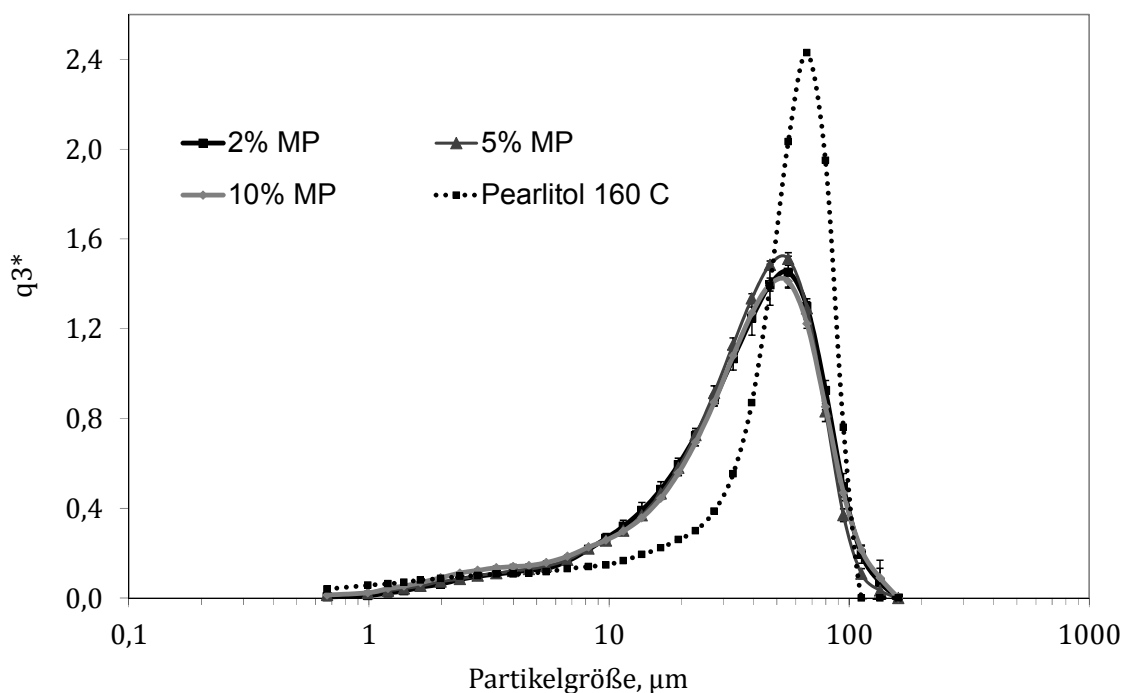


Abbildung 5.11: Partikelgrößenverteilungen der Pulvermischungen aus Pearlitol 160 C und Mikropartikeln (HELOS-SPRAYER mit PowderJet) im Vergleich zum gesiebten Trägermaterial (HELOS-RODOS)

Im Gegensatz zu den Mannitolqualitäten unterscheiden sich die beiden Qualitäten des Sorbitols hinsichtlich der Oberflächenmorphologie deutlich (siehe Abbildung 5.9 c und d). Neosorb P 100 T weist eine sehr raue und vor allem stachelige Oberfläche auf, wohingegen die Oberfläche von C*PharmSorbidex sehr glatt und eben ist. Außerdem weisen die Partikel dieser Qualität eine plättchenartige Form auf. Die Partikelgrößenverteilungen der gesiebten Trägermaterialien und der jeweiligen Pulvermischungen sind für Neosorb P 100 T in Abbildung 5.12 und für C*PharmSorbidex in Abbildung 5.13 dargestellt. Neosorb P 100 T zeigt eine enge Verteilung mit einer mittleren Partikelgröße von 65 µm. Die Partikelgrößenverteilung von C*PharmSorbidex hingegen weist einen deutlichen Feinanteil und einen x_{50} von nur 45 µm auf.

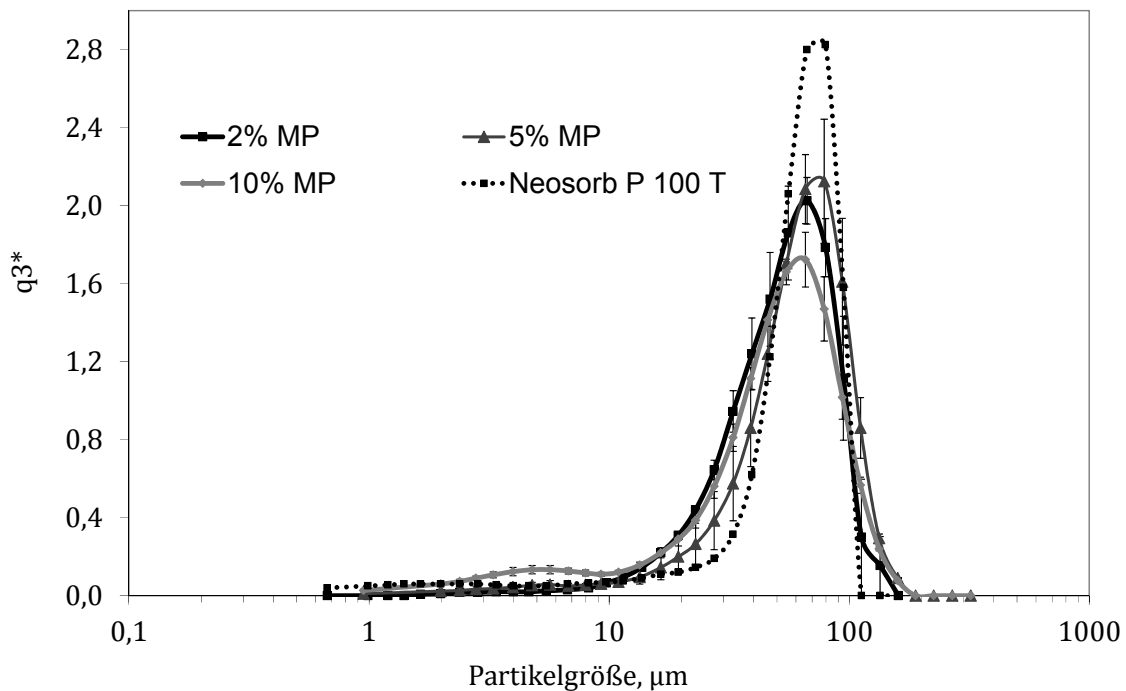
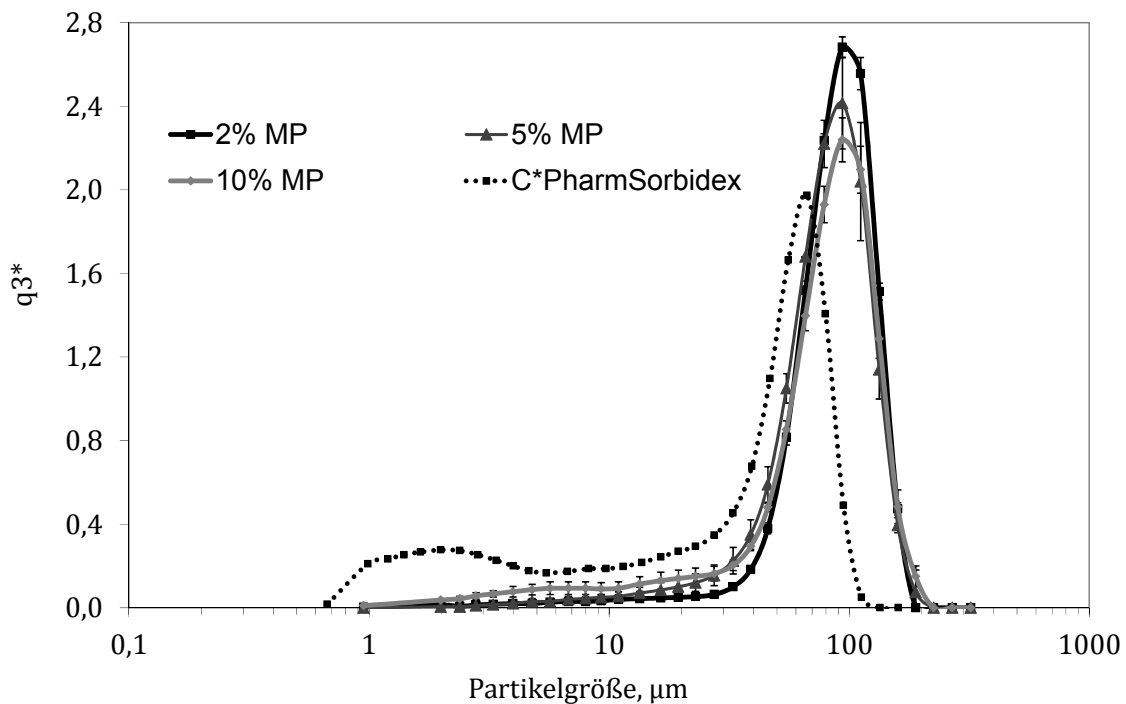


Abbildung 5.12: Partikelgrößenverteilungen der Pulvermischungen aus Neosorb P 100 T und Mikropartikeln (HELOS-SPRAYER mit PowderJet) im Vergleich zum gesiebten Trägermaterial (HELOS-RODOS)

Im Vergleich der Partikelgrößenverteilung von Neosorb P 100 T mit denen der zugehörigen Pulvermischungen zeigt sich, dass das Maximum der Verteilungsfunktion der Pulvermischungen geringfügig zu kleineren Partikelgrößen verschoben ist. Wie auch schon bei den Pulvermischungen mit Pearlitol 200 SD ist dieser Effekt am deutlichsten bei der Mischung mit einem Mikropartikelanteil von 10% zu erkennen. Auch in diesem Fall lässt sich der erhöhte Feinanteil auf vom Träger abgelöste Mikropartikel zurückführen. Im Vergleich der Pulvermischungen aus C*PharmSorbidex mit dem reinen Trägermaterial lässt sich allerdings Gegenteiliges beobachten. Die Partikelgrößenverteilungen der Pulvermischungen sind gegenüber dem reinen Trägermaterial zu größeren Partikelgrößen hin verschoben. Die Siebfraktion des C*PharmSorbidex weist, wie schon beschrieben, einen hohen Feinanteil auf, allerdings sind die Kohäsionskräfte zwischen den kleineren und den größeren Partikel relativ

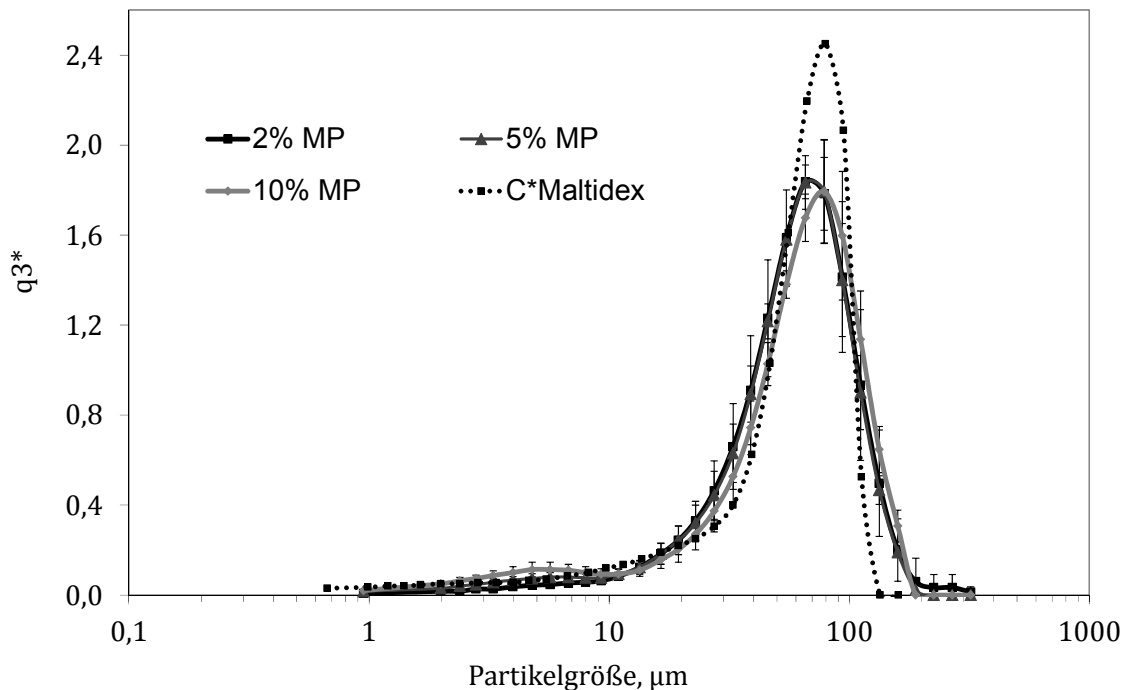
stark. Durch die Druckluftdispergierung mit dem RODOS-Modul werden diese Agglomerate zerstört und die kleineren Partikel somit separiert, was in einer breiteren Verteilung resultiert. Die Dispergierung durch den PowderJet reicht dagegen nicht aus, um diese Kräfte zu überwinden, daher zeigen die Pulvermischungen eine vergleichsweise enge Partikelgrößenverteilung mit einem zu größeren Partikelgrößen verschobenen Maximum. In diesem Fall werden nicht nur der Feinanteil des Sorbitols, sondern auch die Mikropartikel nicht von den Trägerpartikeln abgelöst.



*Abbildung 5.13: Partikelgrößenverteilungen der Pulvermischungen aus C*PharmSorbitex und Mikropartikeln (HELOS-SPRAYER mit PowderJet) im Vergleich zum gesiebten Trägermaterial (HELOS-RODOS)*

Die Partikel der beiden Maltitolqualitäten weisen jeweils eine sehr glatte Oberfläche auf, allerdings unterscheiden sie sich in der Form (siehe Abbildung 5.9 e und f). Die Partikel des C*Maltidex sind eher länglich, die des SweetPearls P 90 unregelmäßig geformt. Auch die mittleren

Partikelgrößen zeigen deutliche Unterschiede auf. Der x_{50} -Wert von C*Maltidex liegt bei 78 μm , der von SweetPearl P 90 bei nur 28 μm .



*Abbildung 5.14: Partikelgrößenverteilungen der Pulvermischungen aus C*Maltidex und Mikropartikeln (HELOS-SPRAYER mit PowderJet) im Vergleich zum gesiebten Trägermaterial (HELOS-RODOS)*

Dieser Unterschied wird auch im Vergleich der Partikelgrößenverteilungen der beiden Maltitolqualitäten, welche in Abbildung 5.14 (C*Maltidex) und Abbildung 5.15 (SweetPearl P 90) dargestellt sind, deutlich. Während C*Maltidex eine enge Verteilung aufweist, ist bei SweetPearl P 90 ein erheblicher Feinanteil erkennbar. Allerdings werden diese kleineren Partikel nur nach Druckluftdispergierung und nicht durch Dispergierung mit dem PowderJet von größeren Partikeln separiert, wie es auch schon bei C*PharmSorbidex zu beobachten war. Die Partikelgrößenverteilungen der Pulvermischungen mit SweetPearl P 90 sind daher gegenüber dem reinen Trägermaterial zu größeren Partikelgrößen hin verschoben, denn auch die Chitosan-Mikropartikel werden durch die Dispergierung mit der

Applikationshilfe nicht von den Trägerpartikeln abgelöst. Im Vergleich der Pulvermischungen mit C*Maltidex und dem reinen Trägermaterial sind dagegen nur geringfügige Unterschiede auszumachen, denn die Partikelgrößenverteilungen sind annähernd identisch.

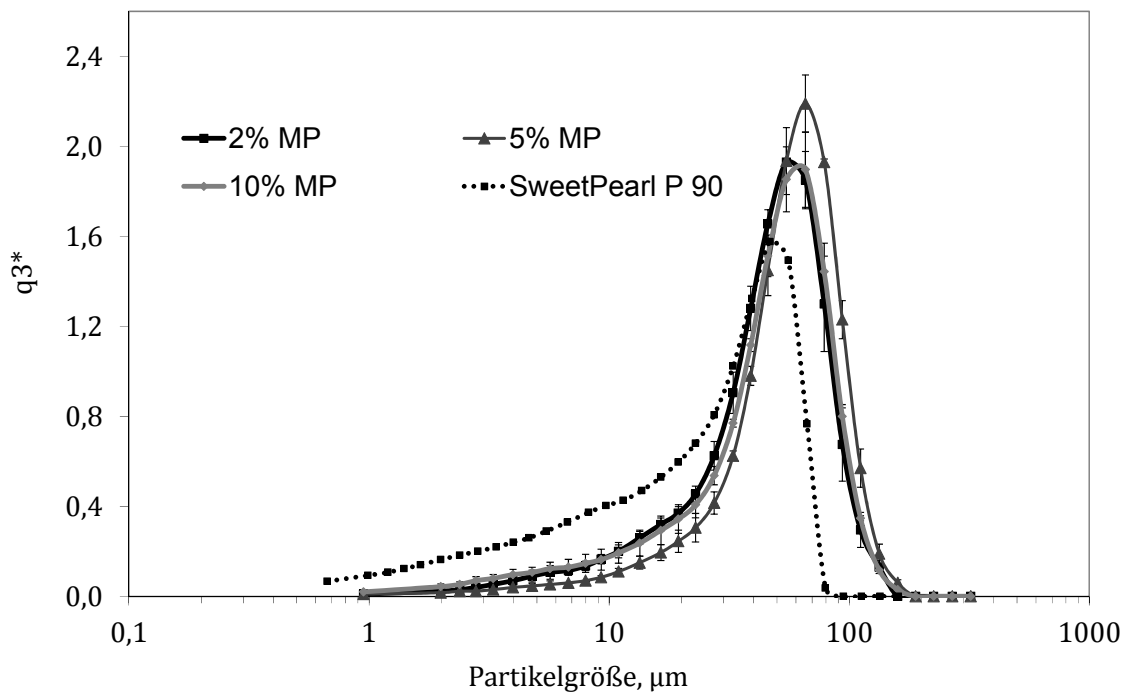


Abbildung 5.15: Partikelgrößenverteilungen der Pulvermischungen aus SweetPearl P 90 und Mikropartikeln im Vergleich zum gesiebten Trägermaterial

Die physikochemische Charakterisierung der Trägermaterialien zeigt, dass es zum Teil deutliche Unterschiede in der Partikel- und Oberflächenmorphologie der Zuckeralkohole gibt. Aufgrund der unterschiedlich gestalteten Trägerpartikel, wird auch das Dispergierverhalten der Pulvermischungen beeinflusst, welches anhand der Partikelgrößenbestimmungen erkennbar war. Unter den verwendeten Trägermaterialien scheinen Pearlit 200 SD und C*Maltidex am geeignetsten, da das reine Trägermaterial und die daraus hergestellten Mischungen jeweils einen geringen Feinanteil aufweisen.

5.3.3 Gleichförmigkeit der abgegebenen Masse

Um den Einfluss der Trägermaterialien auf die Gleichmäßigkeit der abgegebenen Masse zu untersuchen, wurden Dosierungstests, wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, mit dem PowderJet durchgeführt. Die mittleren abgegebenen Massen der Pulvermischungen und die berechneten relativen Standardabweichungen sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst.

Tabelle 5.4: Mittlere abgegebene Massen und relative Standardabweichungen (RSD) der Pulvermischungen (Applikationshilfe PowderJet)

Pulvermischungen	2% MP		5% MP		10% MP	
	mittlere abgegebene Masse, mg	RSD, %	mittlere abgegebene Masse, mg	RSD, %	mittlere abgegebene Masse, mg	RSD, %
Pearlitol 200 SD	5,19	3,5	5,21	3,4	5,17	3,2
Pearlitol 160 C	6,06	4,1	6,34	3,9	5,93	3,1
Neosorb P 100 T	4,60	7,3	4,45	10,3	4,33	8,5
C*PharmSorbidex	5,72	4,7	5,93	5,1	5,41	8,0
C*Maltidex	4,66	8,5	4,95	6,1	5,26	7,0
SweetPearl P 90	4,25	25,8	4,96	5,2	4,89	5,7

Die Dosistests zeigen, dass für alle Pulvermischungen eine mittlere Masse zwischen 4,25 mg und 6,34 mg abgegeben wurde, wobei die Mischungen mit SweetPearl P 90 die geringsten und diejenigen mit Pearlitol 160 C die höchsten Massen aufweisen. Die Dosierung des PowderJets basiert auf einem volumetrischen Prinzip. Aufgrund der unterschiedlichen Partikelgrößen der Trägermaterialien weisen die Pulvermischungen allerdings auch unterschiedliche scheinbare Dichten und Schüttvolumina auf, so dass zwar immer das gleiche Volumen, aber nicht die gleiche Masse dosiert wird. Im Vergleich zu den übrigen Mischungen weisen die Mischungen mit Pearlitol 200 SD die geringsten Standardabweichungen auf, was auf eine gleichmäßigere Dosierung hindeutet. In Abbildung 5.16 sind

die Einzelwerte der abgegebenen Massen gegen die Anzahl der Sprühstöße (Hubzahl) der Mischung aus Pearlitol 200 SD mit einem Mikropartikelanteil von 10% aufgetragen. Die Einzelmassen streuen dabei um den Mittelwert und keine der Massen liegt außerhalb der Grenzen von $\pm 20\%$.

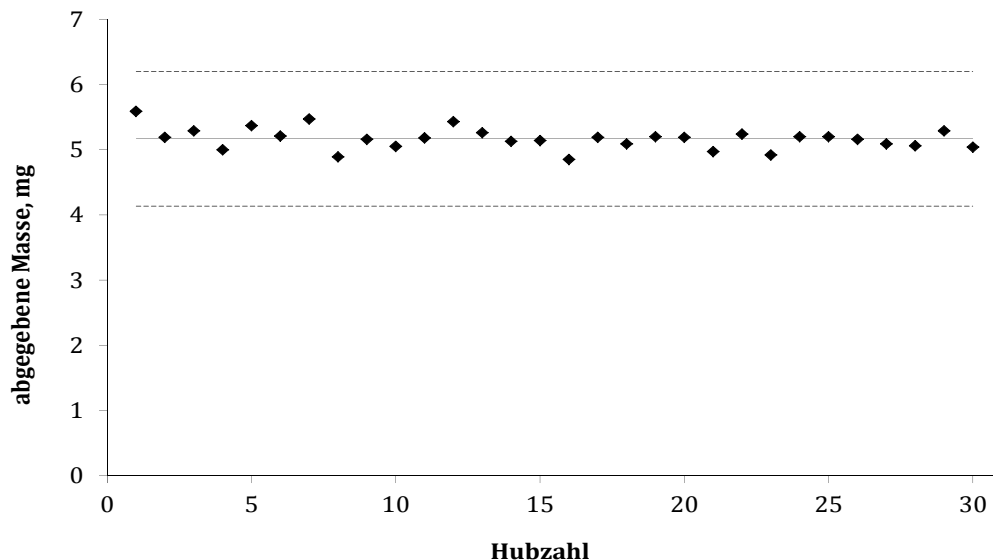


Abbildung 5.16: Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis der 10%igen Pearlitol 200 SD-Pulvermischung; die gestrichelten Linien kennzeichnen die Grenzen von $\pm 20\%$ vom Mittelwert; die durchgezogene Linie gibt den Mittelwert an

Die übrigen Pulvermischungen zeigen ein vergleichbares Dispergierverhalten. Eine Ausnahme stellt allerdings die 2%ige Mischung mit SweetPearl P 90 dar. Die hohe relative Standardabweichung von 25,8% zeigt, dass die abgegebenen Massen sich auffallend voneinander unterscheiden und daher die Dosierung nicht gleichmäßig ist. Die graphische Darstellung der Einzelmassen dieser Mischung (siehe Abbildung 5.17) verdeutlicht, dass die abgegebenen Massen stark um den Mittelwert streuen und dass sieben Werte außerhalb der Grenzen von $\pm 20\%$ liegen. Diese Mischung zeigt daher im Gegensatz zu den übrigen Mischungen ein ungenügendes Dispergierverhalten.

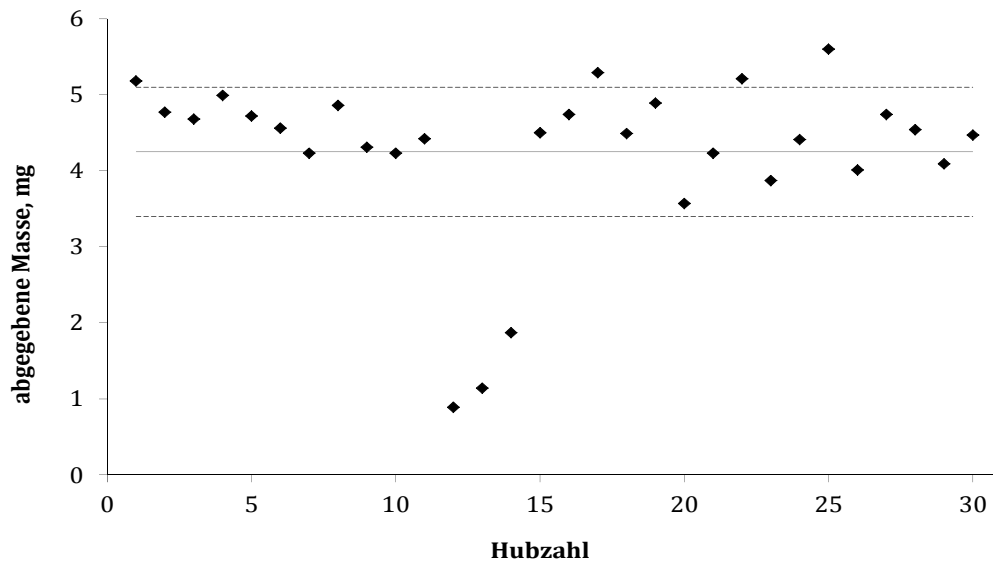


Abbildung 5.17: Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis der 2%igen SweetPearl P 90-Pulvermischung; die gestrichelten Linien kennzeichnen die Grenzen von $\pm 20\%$ vom Mittelwert; die durchgezogene Linie gibt den Mittelwert an

Verglichen mit dem Ergebnis für die „reinen“ Mikropartikel (siehe Abschnitt 5.2.3) zeigen die Pulvermischungen, mit Ausnahme der Mischung mit SweetPearl P 90 und 2% Mikropartikeln, ein verbessertes Dispergierverhalten und eine gleichmäßigere Dosierung nach Dispergierung mit dem PowderJet. Im Hinblick auf die Verbesserung des Dispergierverhaltens der Mikropartikel sind daher alle Trägermaterialien mit Ausnahme von SweetPearl P 90 geeignet.

5.3.4 Nasale Deposition

Die nasale Deposition der Pulvermischungen wurde, wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben, mit Hilfe des PowderJets bestimmt. Die Reproduzierbarkeit der Dreifachbestimmungen für jede Pulvermischung wurde mit Hilfe der modifizierten f_2 -Statistik überprüft. Mit der Berechnung des Ähnlichkeitsfaktors (f_2) kann das Ausmaß der Übereinstimmung der Einzelmessungen einer Dreifachbestimmung angegeben werden. Bei einem

f_2 -Wert > 50 sind sich die Ergebnisse sehr ähnlich, das heißt reproduzierbar, bei $f_2 = 100$ sind sie identisch. Die berechneten f_2 -Werte sind in Tabelle 5.5 wiedergegeben. Für alle Depositionsbestimmungen ergibt sich ein f_2 -Wert > 50 , das heißt die Einzelmessungen einer Dreifachbestimmung führten zu untereinander vergleichbaren Werten und zeigen nur eine geringe Variabilität.

Tabelle 5.5: f_2 -Werte der Depositionsbestimmungen bei 0 l/min und 15 l/min

Pulvermischungen	0 l/min			15 l/min		
	2% MP	5% MP	10% MP	2% MP	5% MP	10% MP
Pearlitol 200 SD	75,55	56,17	61,74	73,95	51,32	63,98
Pearlitol 160 C	74,53	63,49	60,17	69,71	55,20	64,41
Neosorb P 100 T	65,52	74,06	66,53	62,16	63,95	65,33
C*PharmSorbidex	55,46	68,17	65,12	60,92	56,09	59,43
C*Maltidex	64,29	69,96	70,80	59,26	59,37	66,48
SweetPearl P 90	84,67	63,78	68,10	50,32	55,76	67,10

Für die Evaluierung der Depositionsprofile der Pulvermischungen wurden zunächst die post-nasalen Fraktionen verglichen. In Abbildung 5.18 sind die Ergebnisse der Bestimmungen bei 0 l/min dargestellt.

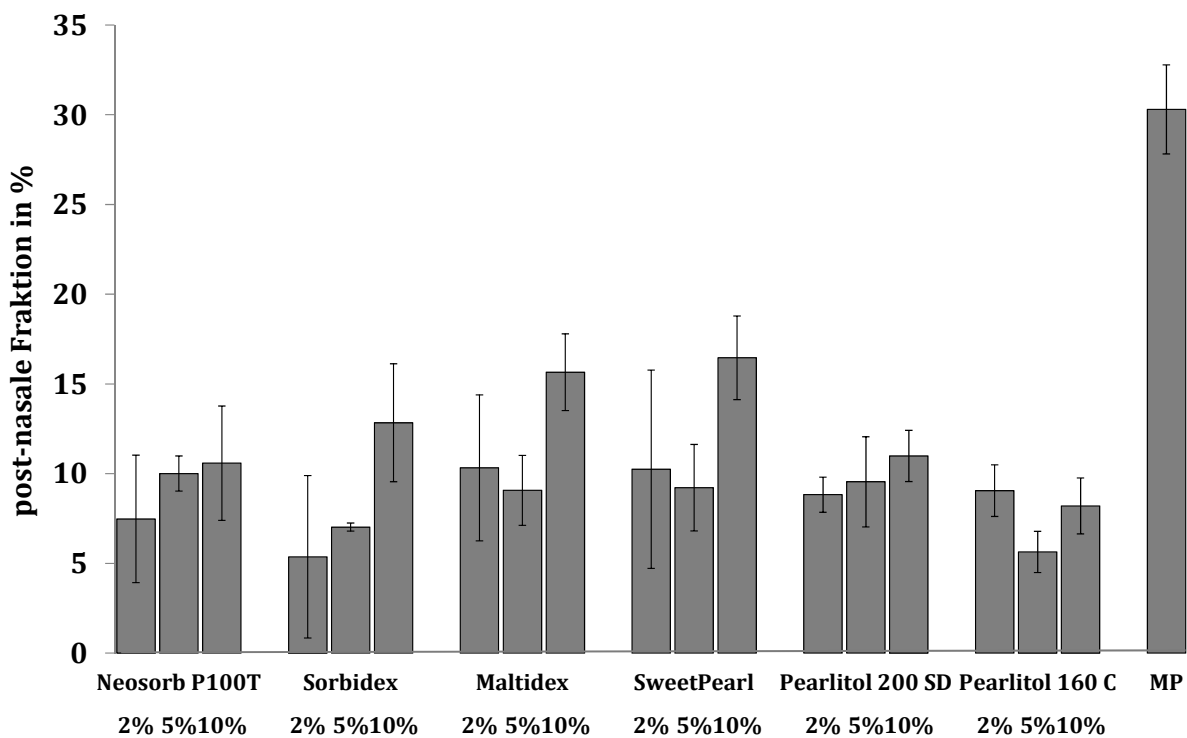


Abbildung 5.18: Post-nasale Fraktionen der Pulvermischungen bei 0 l/min, n=3, MP \triangleq „reinen“ Mikropartikeln, Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung

Wie bereits in Abschnitt 5.2.4 diskutiert, weist das Depositionsprofil der „reinen“ Mikropartikel eine sehr hohe post-nasale Fraktion von 30% auf. Anhand der Ergebnisse der hergestellten Pulvermischungen wird deutlich, dass durch Adhäsion der Mikropartikel an größere Trägerpartikel dieser Anteil im Mittel auf nur 10% reduziert werden kann. Der Unterschied in den post-nasalen Fraktionen der Pulvermischungen gegenüber den „reinen“ Mikropartikel ist dabei für alle verwendeten Trägermaterialien statistisch signifikant ($p < 0,001$). Wie auch schon aufgrund der Partikelgrößenmessungen erwartet wurde, führt ein Mikropartikelanteil von 10% im Vergleich zu 2% und 5% tendenziell zu den höchsten post-nasalen Fraktionen, was besonders bei den mit C*PharmSorbidex hergestellten Mischungen deutlich wird. Die Pulvermischungen mit Pearlitol 200 SD zeigen untereinander in der Tendenz die geringsten

Unterschiede in der post-nasalen Fraktion und im Vergleich zu den übrigen Trägermaterialien die kleinste Variabilität. Allerdings sind die Unterschiede in den post-nasalen Fraktionen aller Pulvermischungen in Abhängigkeit vom Mikropartikelanteil für das jeweilige Trägermaterial statistisch nicht signifikant.

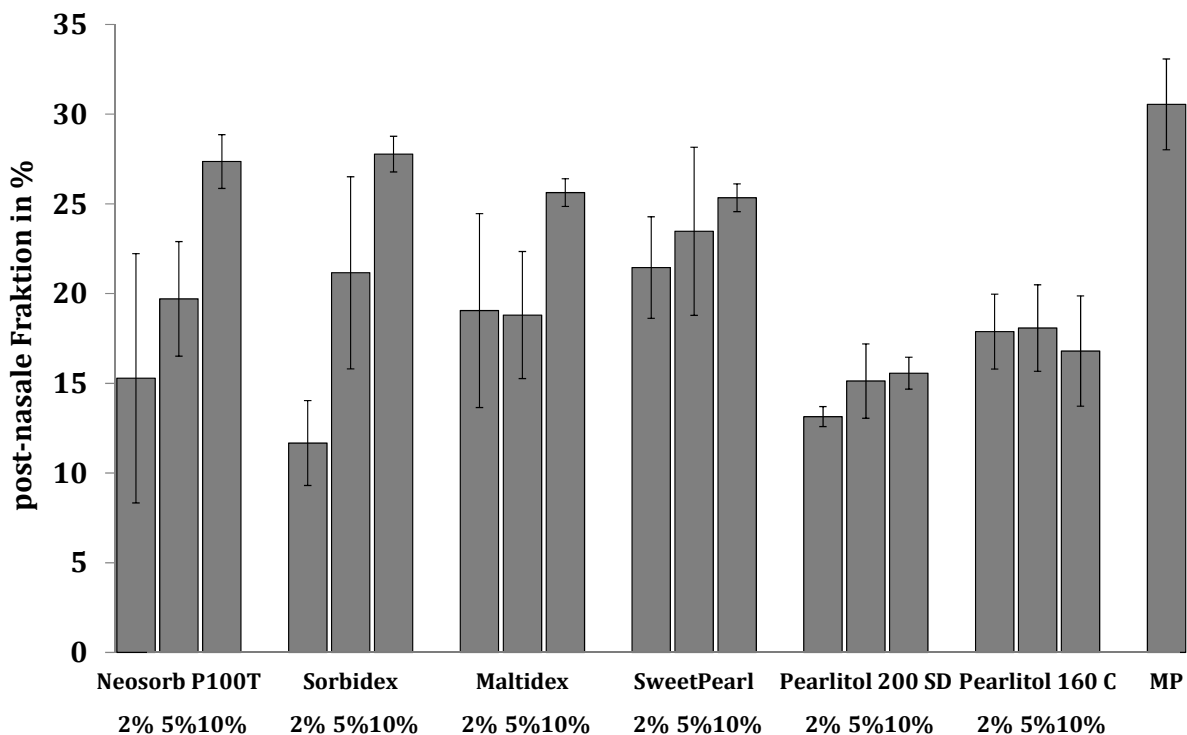


Abbildung 5.19: Post-nasale Fraktionen der Pulvermischungen bei 15 l/min, $n=3$, MP \triangleq „reinen“ Mikropartikeln, Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung

Die Ergebnisse der Depositionsuntersuchungen der Pulvermischungen bei simuliertem Einatemstrom sind in Abbildung 5.19 dargestellt. Anhand dieser Bestimmungen wird deutlich, dass die post-nasalen Fraktionen bei 15 l/min deutlich höher sind als bei 0 l/min, denn aufgrund des angelegten Luftstroms kommt es zu einer erhöhten Deagglomeration der Pulveragglomerate, das heißt Mikropartikel werden vermehrt von den Trägerpartikeln abgelöst. Die abgelösten Mikropartikel können dann

aufgrund ihrer geringen Partikelgröße dem Luftstrom folgen und werden erst in hinteren Abschnitten der Nasenhöhle beziehungsweise außerhalb der Nase abgeschieden, was zu einer hohen post-nasalen Fraktion führt. Im Fall der Pulvermischungen beträgt die durchschnittliche post-nasale Fraktion bei 15 l/min 20%. Eine signifikante ($p < 0,001$) Reduzierung der post-nasalen Fraktion im Vergleich zu den „reinen“ Mikropartikel (30%) konnte bei den Mischungen mit Pearlitol 200 SD und Pearlitol 160 C ermittelt werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Wechselwirkungen der Mikropartikel mit diesen Trägermaterialien im Vergleich zu den übrigen verwendeten Materialien stärker sind, was unter anderem auf die Oberflächenmorphologie der Mannitolpartikel zurückzuführen ist. Anhand der REM-Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Oberfläche rau und uneben ist und in diesen Unebenheiten können sich die Mikropartikel unter anderem mechanisch verhaken, was zu einer Erhöhung der Adhäsion führt. Die vergleichende Beurteilung der post-nasalen Fraktionen der Pulvermischungen zeigt, dass die Verwendung von Pearlitol 200 SD als Trägermaterial am vielversprechendsten ist. Daher werden für diese Pulvermischungen im Folgenden die Depositionsprofile evaluiert, welche in Abbildung 5.20 (0 l/min) und Abbildung 5.21 (15 l/min) dargestellt sind. Die Depositionsprofile der Bestimmungen ohne simulierten Einatemstrom zeigen, dass 40–45% des Proteins bereits im Nasenvorhof abgeschieden wurden. Dies ist unter anderem in der Anatomie der Nase begründet, denn der Nasenvorhof stellt den engsten Bereich der Nase dar, den die größeren Trägerpartikel schwerer passieren können als die Mikropartikel. Die Deposition in den unteren Nasenmuscheln und dem Nasopharynx ist im Vergleich zu dem idealen Profil ausreichend, der abgeschiedene Proteinanteil in den mittleren und oberen Nasenmuscheln fällt dagegen etwas zu gering aus.

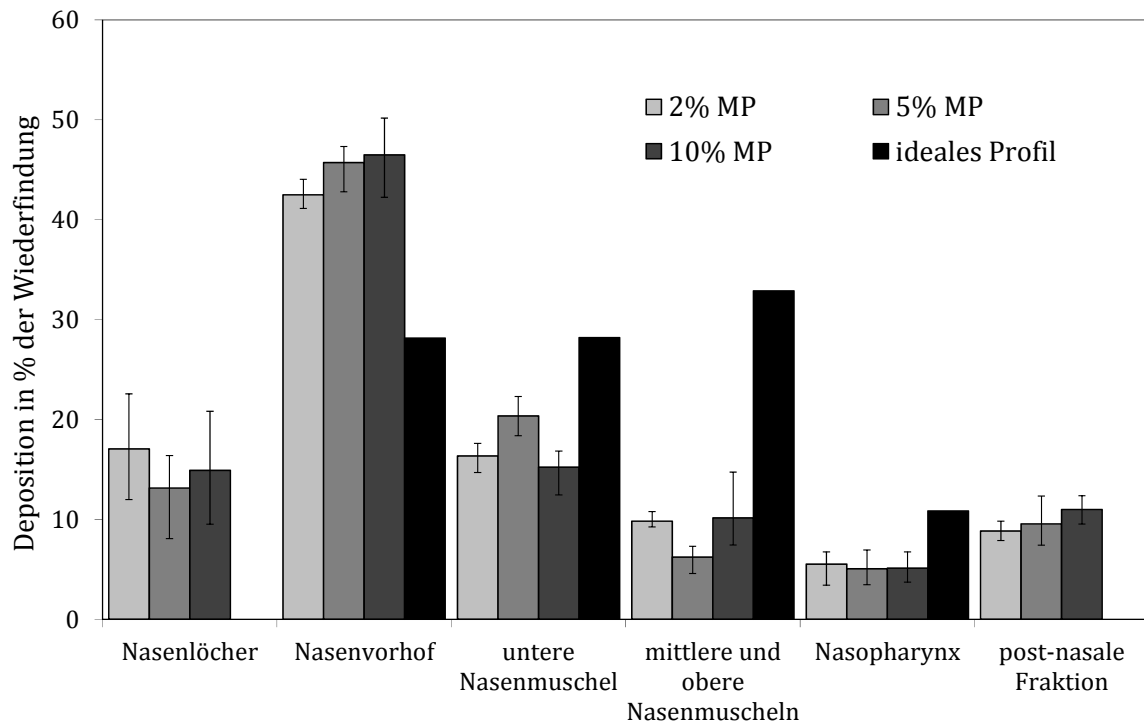


Abbildung 5.20: Depositionsprofile der Mischungen mit Pearlitol 200 SD und 2%, 5% und 10% Mikropartikeln bei 0 l/min, n=3, Fehlerbalken kennzeichnen min-max

Im Vergleich der Depositionsprofile untereinander zeigen die drei Pulvermischungen nur geringfügige Unterschiede. Mit steigendem Mikropartikelanteil erhöht sich die post-nasale Fraktion und auch die Deposition im Nasenvorhof nimmt zu, allerdings sind diese Unterschiede statistisch nicht signifikant. Die Depositionsprofile der Bestimmungen bei 15 l/min zeigen, dass sich bei simuliertem Einatemstrom die Deposition nach rechts verschiebt, das heißt die Partikel werden vermehrt in hinteren Bereichen der Nase abgeschieden. Im Nasenvorhof wurden im Mittel nur noch 35% des Proteins abgeschieden und die Proteinmenge in den mittleren und oberen Nasenmuscheln hat sich deutlich erhöht. Allerdings ist die abgeschiedene Proteinmenge im Bereich der Nasenmuscheln im Vergleich zum idealen Profil immer noch zu gering. Aufgrund der Ergebnisse der Depositionsuntersuchungen lässt sich zusammenfassend

sagen, dass die Depositionsprofile der Pulvermischungen mit Pearlitol 200 SD zwar zufriedenstellend, aber nicht optimal sind.

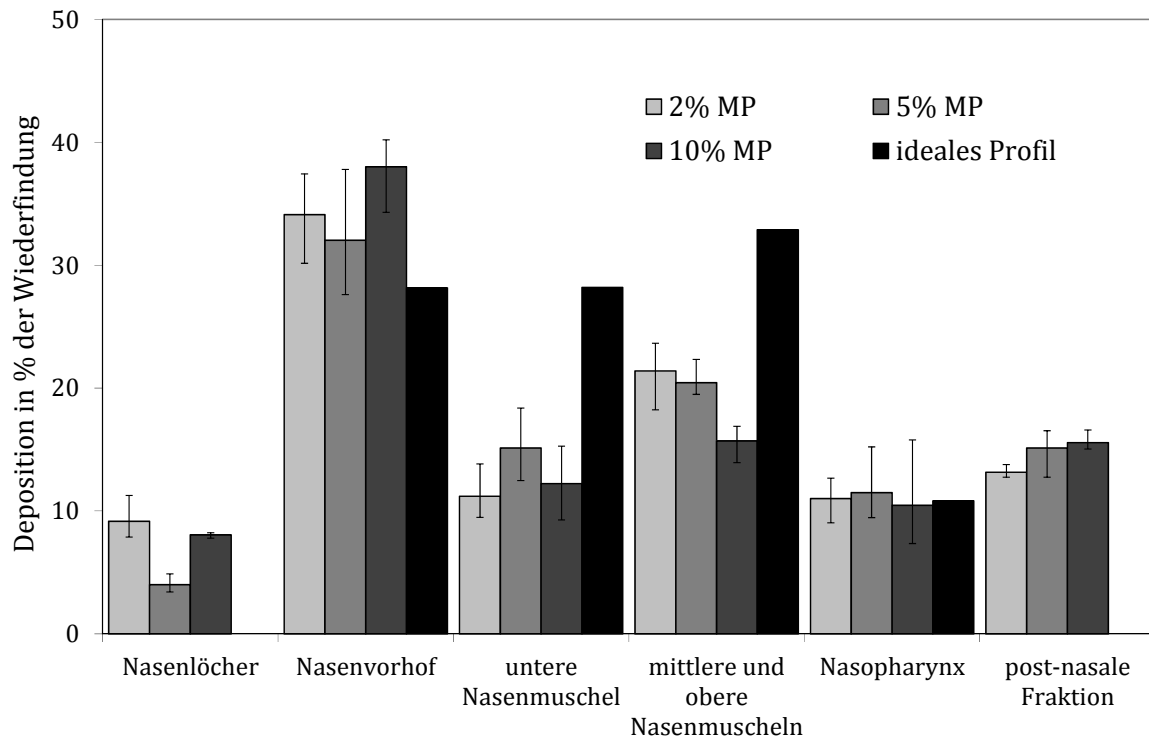


Abbildung 5.21: Depositionsprofile der Mischungen mit Pearlitol 200 SD und 2%, 5% und 10% Mikropartikeln bei 15 l/min, n=3, Fehlerbalken kennzeichnen min-max

Die nasale Deposition von Partikeln wird allerdings nicht nur durch die Formulierung, sondern unter anderem auch durch die Art der Applikationshilfe beeinflusst (siehe Abschnitt 4.2.3). Um den Einfluss der Applikationshilfe auf die nasale Deposition zu untersuchen, wurde für die Bestimmung der Depositionsprofile der 5%igen Pearlitol 200 SD-Mischung daher neben dem PowderJet auch das Powder UDS verwendet. Die Depositionsprofile sind in Abbildung 5.22 (0 l/min) und Abbildung 5.23 (15 l/min) dargestellt. Das Depositionsprofil bei 0 l/min zeigt, dass

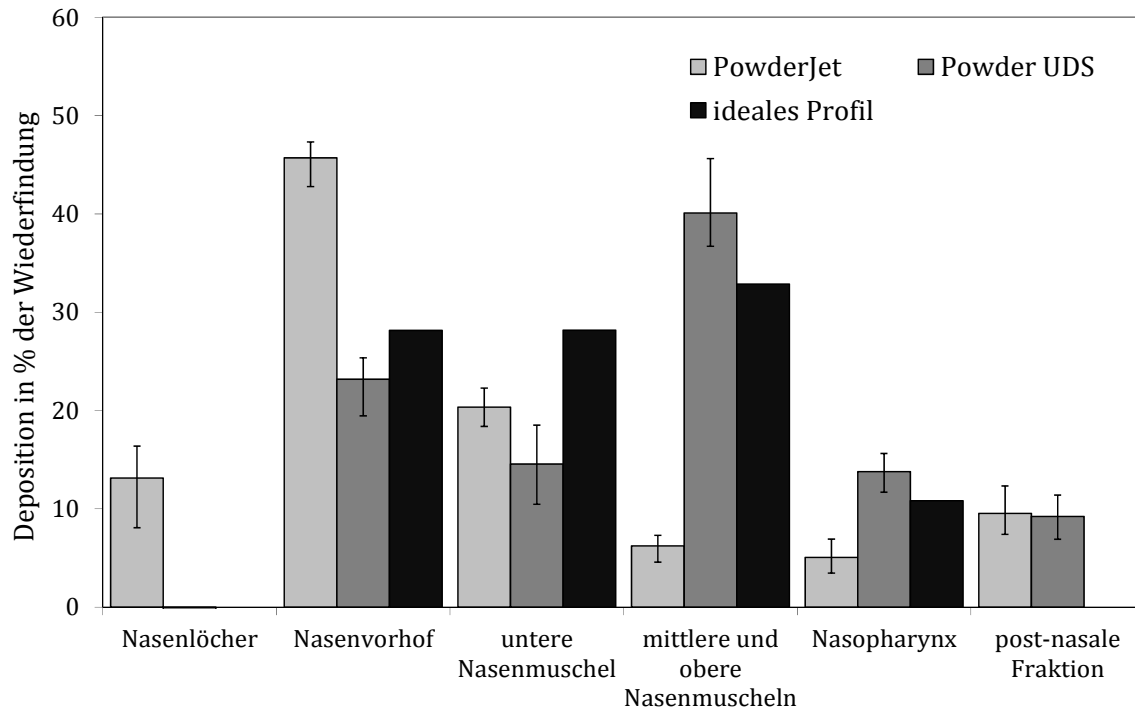


Abbildung 5.22: Depositionsprofile der Mischung aus Pearlitol 200 SD und 5% Mikropartikeln bei Verwendung des PowderJets und des Powder UDS, 0 l/min, n=3, Fehlerbalken kennzeichnen min-max

im Vergleich zum idealen Profil eine adäquate Proteinmenge sowohl im Nasenvorhof und den mittleren und oberen Nasenmuscheln als auch im Nasopharynx abgeschieden wurde. Lediglich in den unteren Nasenmuscheln fällt die Deposition zu gering aus. Im Vergleich zu dem Depositionsprofil nach Dispergierung mit dem PowderJet wird deutlich, dass die Verwendung des Powder UDS zu einer gleichmäßigeren Verteilung der Formulierung in der Nasenhöhle führt. Die Deposition in den Nasenlöchern und dem Nasenvorhof wurde reduziert und dafür ein größerer Anteil des Proteins in den hinteren Bereichen der Nase abgeschieden, ohne dass es dabei zu einer Erhöhung der post-nasalen Fraktion gekommen ist.

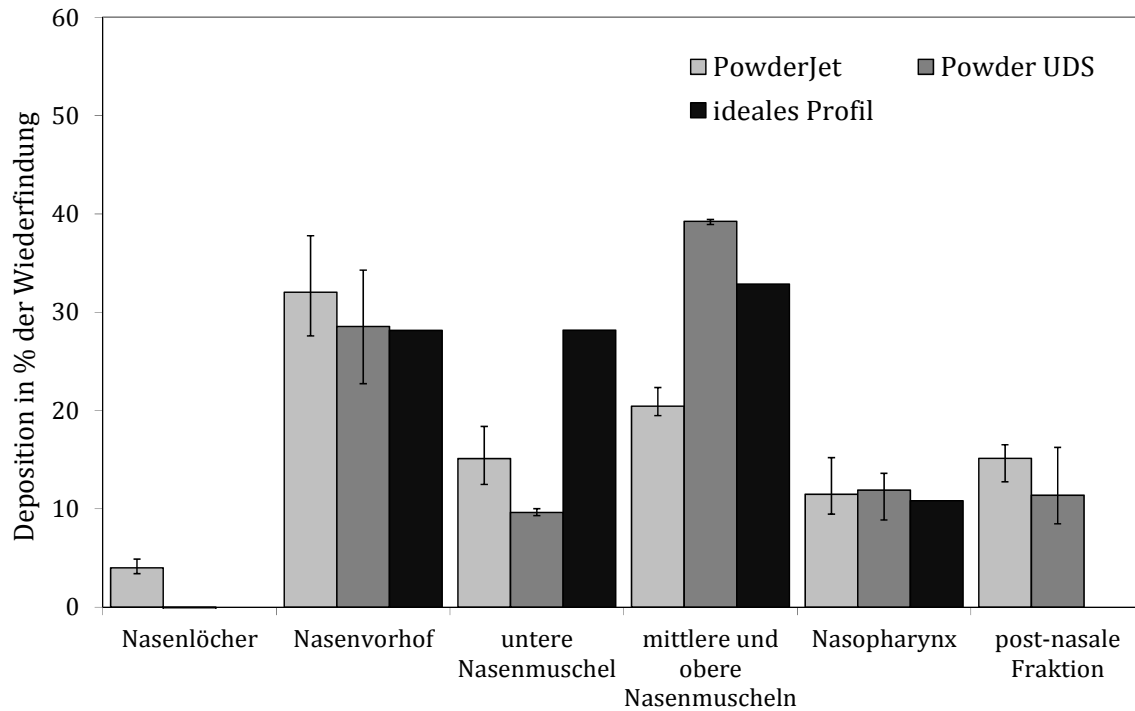


Abbildung 5.23: Depositionsprofile der Mischung aus Pearlitol 200 SD und 5% Mikropartikeln bei Verwendung des PowderJets und des Powder UDS, 15 l/min, n=3, Fehlerbalken kennzeichnen min-max

Das Depositionsprofil bei simuliertem Einatemstrom und Verwendung des Powder UDS zeigt, dass im Vergleich zum idealen Profil eine angemessene Proteinmenge im Nasenvorhof, den mittleren und oberen Nasenmuscheln sowie im Nasopharynx abgeschieden wurde. Allerdings haben die unteren Nasenmuscheln zu wenig Protein erreicht. Verglichen mit dem Depositionsprofil nach Dispergierung mit dem PowderJet, führte die Verwendung des Powder UDS zu einer geringeren post-nasalen Fraktion und zu einer verbesserten Deposition im Bereich der mittleren und oberen Nasenmuscheln.

Durch die Implementierung von Pulvermischungen kann die nasale Deposition der Antigen-beladenen Mikropartikel verbessert werden. Vor allem konnte gezeigt werden, dass durch Adhäsion der Mikropartikel an größere Trägerpartikel die post-nasale Fraktion signifikant reduziert

werden kann. Unter den verwendeten Trägermaterialien zeigten dabei die Pulvermischungen mit Pearlitol 200 SD die vielversprechendsten Ergebnisse. Die weiterführenden Untersuchungen zeigten, dass die nasale Deposition abhängig von der verwendeten Applikationshilfe ist. Die Dispergierung mit dem Powder UDS führt dabei im Vergleich zum PowderJet zu besseren Depositionsprofilen.

5.4 Lagerstabilität

Während der Herstellung und Lagerung der Chitosan-Mikropartikel wird das Protein vielen Stressfaktoren ausgesetzt. Dazu gehören unter anderem Belastungen durch erhöhte Temperaturen, Scherung, Veränderungen des pH-Werts und unterschiedliche relative Feuchten, welche zu einer Denaturierung des Proteins führen können. Die Hydrolyse von Peptidbindungen und Disulfidbrücken ist eine häufig vorkommende Reaktion, die die Proteinstabilität beeinträchtigt und zu Polypeptidfragmenten führt. Neben der Zerstörung der Primärstruktur kann es auch zu Konformationsänderungen, das heißt zu Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins kommen (Arakawa et al., 2001). Dies kann zum Beispiel bei BSA zu einem Verlust der α -Helizität, zu einem vollständigen Auffalten oder zur Aggregation des Proteins führen. Bei Proteinen, die viele Cysteinreste aufweisen, können die freien Sulfhydrylgruppen zur Disulfidform oxidiert werden. Dadurch können neue Disulfidbrücken innerhalb desselben Moleküls aber auch zu anderen Molekülen geknüpft werden, so dass Dimere, Trimere oder hochmolekulare Aggregate entstehen können (Arakawa et al., 2001).

Eine Änderung in der Konformation des Proteins führt aber nicht zwingend zu einer Zerstörung seiner Epitope (antigene Determinanten). Epitope

können aus einer einzigen Aminosäuresequenz bestehen, die auch in der Primärstruktur verankert ist (kontinuierliches oder lineares Epitop) oder aus in der Primärstruktur nicht zusammenhängender Polypeptidketten bestehen, die nur durch die dreidimensionale Struktur nebeneinander zu liegen kommen (diskontinuierliches Epitop). Wenn es sich um kontinuierliche Epitope handelt, bleiben diese auch nach einer Denaturierung bestehen und können durch Antikörper oder Antigenrezeptoren erkannt werden. Alleine diskontinuierliche Epitope können nach einer Auffaltung nicht mehr erkannt werden, das heißt es kann auch keine Immunantwort hervorgerufen werden (Janeway et al., 2002).

Da die Proteinstabilität durch Formulierungsprozesse und Lagerung beeinflusst werden kann, wurde neben der Beurteilung der Proteinintegrität direkt nach dem Herstellprozess eine sechsmonatige Untersuchung der Lagerstabilität der BSA-haltigen Mikropartikel durchgeführt. Zur Beurteilung des Lösungsmiteleinflusses auf die Proteinstabilität während der Herstellung und Lagerung wurden die Mikropartikel aus verdünnter Salzsäure (0,01 N, pH 2,6) und 1%iger (V/V) Essigsäure hergestellt. Zusätzlich wurden Chitosan-Mikropartikel, die OVA als Antigen enthielten, in die Untersuchungen mit einbezogen. Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden außerdem natives BSA und OVA untersucht.

5.4.1 Durchführung

Die BSA-beladenen Mikropartikel, die aus Salzsäure (Chito/BSA HCl) und Essigsäure (Chito/BSA HAc) sprühgetrocknet wurden sowie die OVA-haltigen Mikropartikel (Chito/OVA) und die nativen Proteine (BSA, OVA) wurden zunächst in 20 ml Glasgefäße mit Kunststoffdeckel aliquotiert, welche einen moderaten Austausch mit den Umgebungsbedingungen

zulassen. Diese wurden dann unter den in Tabelle 5.6 angegebenen Lagerbedingungen aufbewahrt und zu definierten Zeitpunkten (0, 1, 2, 4, 8, 12 und 24 Wochen) Proben entnommen. Der Proteingehalt der Mikropartikel wurde mit Hilfe des BCA-Assays bestimmt und der ermittelte Gehalt direkt nach der Herstellung als 100% festgesetzt. Die Proteinintegrität wurde mit Hilfe der SDS-PAGE und der CD-Spektroskopie untersucht.

Tabelle 5.6: Lagerbedingungen der Stabilitätsuntersuchungen

Temperatur	Relative Feuchte (rF)
-30°C	Umgebungsfeuchte
3°C	Umgebungsfeuchte
25°C	40-50%
25°C	60%
40°C	75%

5.4.2 Tag 0

Zunächst wurde der Einfluss des Herstellungsprozesses auf die Stabilität der Proteine untersucht. In Abbildung 5.24 ist die SDS-Page der verschiedenen Mikropartikel dargestellt. Im Vergleich zu den jeweiligen Referenzsubstanzen zeigen alle Proben dasselbe Migrationsmuster. Die Banden der Proben stimmen mit den Banden der jeweiligen Referenz überein. Daraus lässt sich ableiten, dass das Lösungsmittel im Fall der BSA-haltigen Mikropartikel und der Sprühtrocknungsprozess in Bezug auf alle Proben keinen Einfluss auf das Molekulargewicht der Proteine haben. Auch eine Aggregation der Proteine kann ausgeschlossen werden, da im

Vergleich zu den Referenzsubstanzen keine zusätzlichen Banden sichtbar sind.

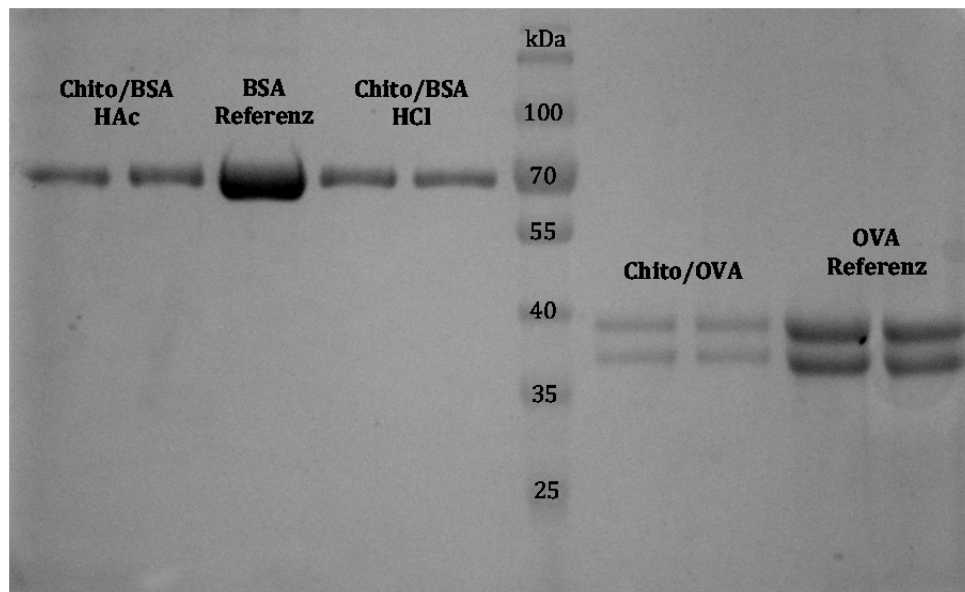


Abbildung 5.24: SDS-PAGE von Chito/BSA HAC, Chito/BSA HCl und Chito/OVA direkt nach der Herstellung

Die CD-Spektren der BSA-haltigen Proben sind in Abbildung 5.25 dargestellt. Die Spektren der Proben und der BSA Referenz zeigen eine deutlich negative Elliptizität im fernen UV-Bereich mit Minima bei 208 nm und 220 nm. Das Spektrum der Referenz ist charakteristisch für BSA (Takeda et al., 1989; Brahma et al., 2005) und weist auf eine überwiegend α -helikale Struktur des Proteins hin. Die CD-Spektren von Chito/BSA HCl und Chito/BSA HAC sind identisch, zeigen im Vergleich zum Referenz-Spektrum jedoch geringfügige Unterschiede; das heißt beide Lösungsmittel haben den gleichen Einfluss auf die Konformation des Proteins. Die Sekundärstruktur von BSA umfasst etwa 67% α -Helix, 10% turns und außerdem flexible Regionen (Carter, 1994) und diese Konformation kann durch äußere Einflüsse wie Temperatur oder pH-Wert verändert werden. Murayama und Tomida (2004) beschreiben, dass bei einer Temperatur von 57°C der Anteil an α -Helix durch Denaturierung der Kurzsegmentketten

abnimmt und es bei einer Temperatur von über 76°C zu einer irreversiblen Bildung von intermolekularen β -Faltblattstrukturen kommt. Außerdem ist die thermische Denaturierung von BSA pH-abhängig. Takeda et al. (1989) konnten zeigen, dass die Strukturveränderungen des BSAs bei einem pH-Wert von 2,8 und einem Temperaturbereich von 2-65°C reversibel sind. Bei einem pH-Wert von 7,0 war die Veränderung nur partiell reversibel. Allerdings lag das BSA bei pH 2,8 und 2°C nur zu 51% als α -Helix vor, bei pH 7,0 dagegen zu 67%.

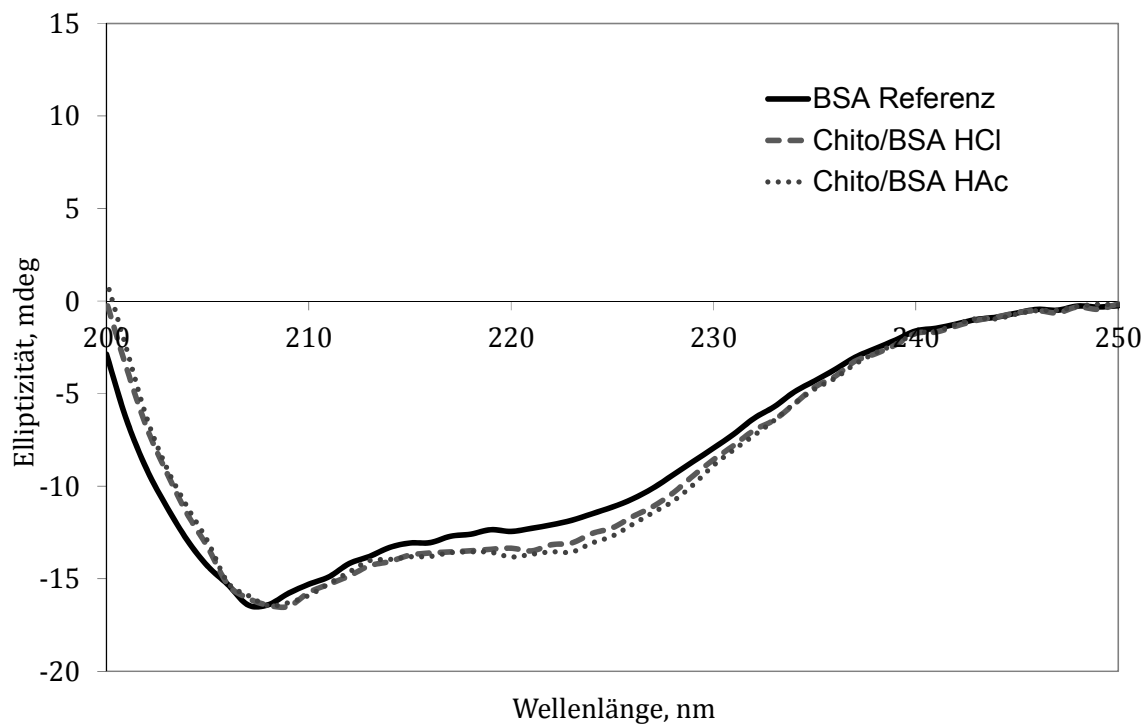


Abbildung 5.25: CD-Spektren von Chito/BSA HCl und Chito/BSA HAc direkt nach Herstellung der Mikropartikel

Während der Sprühtrocknung der Mikropartikel lagen die Auslasstemperatur bei ca. 53°C und der pH-Wert der Lösungen zwischen 2,4 und 2,6. Die Proteinstabilität von Chito/BSA HCl und Chito/BSA HAc wurde daher durch die erhöhte Temperatur und den sauren pH-Wert leicht

beeinflusst. Dies führte zu einer Abnahme des Anteils an α -Helix. Allerdings konnte die überwiegend α -helikale Struktur des BSAs erhalten werden.

Die CD-Spektren der OVA Referenz und Chito/OVA sind in Abbildung 5.26 dargestellt. Das Referenzspektrum zeigt eine deutlich negative Elliptizität im fernen UV-Bereich und ist charakteristisch für OVA (Mellet et al., 1996).

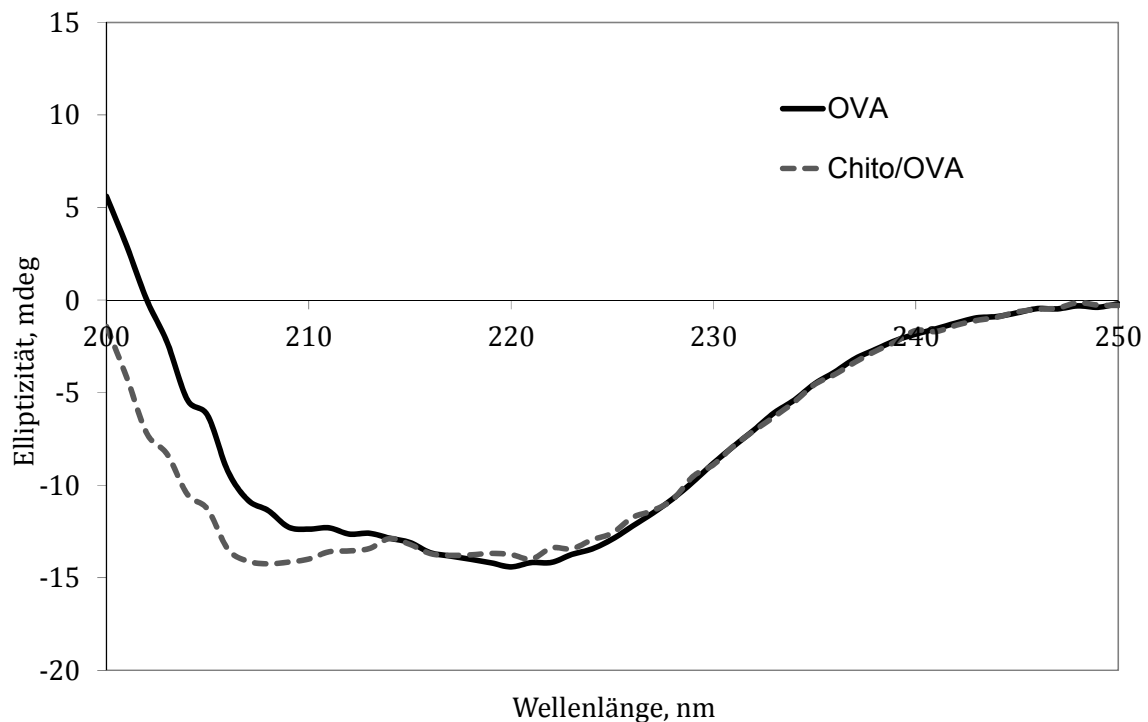


Abbildung 5.26: CD-Spektrum von Chito/OVA direkt nach Herstellung der Mikropartikel

Anhand von CD-Spektren haben Batra et al. (1989) die Zusammensetzung der Sekundärstruktur analysiert. Danach enthält OVA zu 33% α -Helix, 5% β -Faltblatt und 62% random coil, das heißt eine ungeordnete Struktur. Außerdem ist das Protein durch eine Disulfidbrücke quervernetzt und enthält vier freie Sulfhydrylgruppen (Fothergill und Fothergill, 1970). Das Spektrum von Chito/OVA weist auch eine deutlich negative Elliptizität im fernen UV-Bereich auf, allerdings ist es mit dem Referenzspektrum nicht identisch. Das zweite Minimum hat sich von 209 nm zu 206 nm verschoben und weist gegenüber dem Referenzspektrum eine negativere Elliptizität

auf. Durch den Herstellungsprozess wurde die Sekundärstruktur des OVAs leicht verändert, allerdings gibt es keinen Hinweis auf Denaturierung des Proteins. Koseki et al. (1988) konnten zeigen, dass auch bei niedrigen pH-Wert die globuläre Konformation des OVAs nicht verändert wird, allerdings wird das Molekül im Ganzen flexibler. Aufgrund der erhöhten Flexibilität des Moleküls wird das Protein allerdings empfindlicher gegenüber Proteolyse und Denaturierung. Hegg et al. (1979) konnten nachweisen, dass die Denaturierungstemperatur von OVA bei Erniedrigung des pH-Werts sinkt und es zu einer erhöhten Aggregationstendenz kommt. Des Weiteren kann es durch den Einfluss von Temperatur und pH-Wert auch zu einer Erniedrigung des Anteils an α -Helix und damit einhergehend zu einer Erhöhung des Anteils an β -Faltblattstrukturen innerhalb des Moleküls kommen (Hu und Du, 2000).

Da die Auslasstemperatur und damit die thermische Belastung während der Sprühtrocknung höchstens 55°C betrug, ist eine Denaturierung, auch wenn das Protein kurzzeitig in einer sauren Lösung vorlag, unwahrscheinlich. Die Unterschiede in den CD-Spektren der Referenz und der Probe sind daher auf ein verändertes Verhältnis von α -Helix, β -Faltblatt und random coil zurückzuführen.

Die Proteingehalte der Mikropartikel wurden direkt nach der Herstellung bestimmt und sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst. Diese wurden für die nachfolgenden Untersuchungen als 100% definiert.

Tabelle 5.7: Übersicht der Proteingehalte der Chitosan-Mikropartikel

Mikropartikel	Gehalt (m/m) \pm SD
Chito/BSA HCl	19,27% \pm 0,87%
Chito/BSA HAc	17,86% \pm 1,03%
Chito/OVA	17,98% \pm 1,14%

5.4.3 Vier Wochen

Während der ersten vier Wochen der Lagerzeit wurden Proben nach einer, zwei und nach vier Wochen entnommen. In Abbildung 5.27 ist die SDS-PAGE des nativen BSAs nach einer Lagerzeit von vier Wochen bei unterschiedlichen Bedingungen dargestellt. Im Vergleich zur BSA Referenz lassen sich bei allen gelagerten Proben keine Unterschiede feststellen. Die Banden stimmen überein und weisen alle eine vergleichbare Intensität der Färbung auf, was auf einen vergleichbaren Proteingehalt hinweist. Daraus lässt sich ableiten, dass die Primärstruktur des nativen BSAs während einer Lagerzeit von vier Wochen auch durch erhöhte Temperaturen und Luftfeuchten nicht verändert wurde.

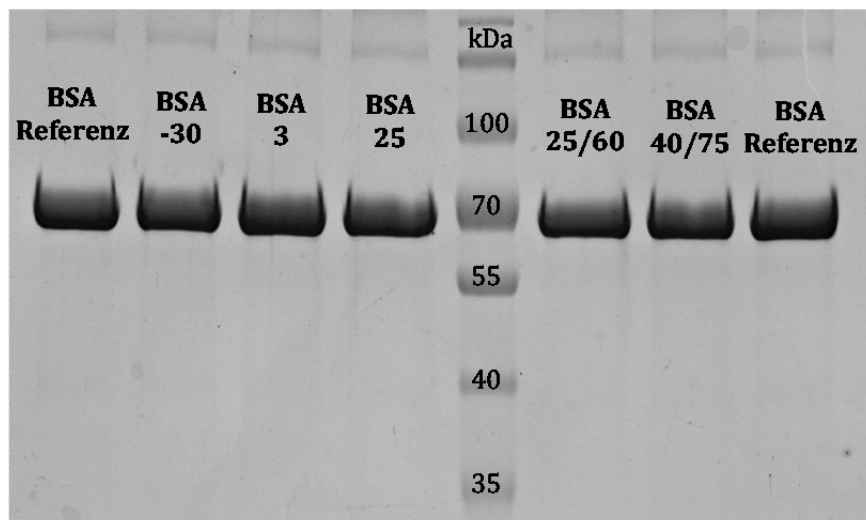


Abbildung 5.27: SDS-PAGE von BSA nach einer Lagerzeit von 4 Wochen

Die CD-Spektren der BSA-Proben (siehe Abbildung 5.28) sind identisch und zeigen, dass die Proben untereinander die gleiche Sekundärstruktur aufweisen. Allerdings zeigen die Spektren der gelagerten Proben im Vergleich zum Spektrum der BSA Referenz die gleichen, geringen Unterschiede, das heißt während der Lagerung ist es zu einer Veränderung in der Sekundärstruktur gekommen. Die Proben weisen aber noch immer eine überwiegend α -helikale Struktur auf.

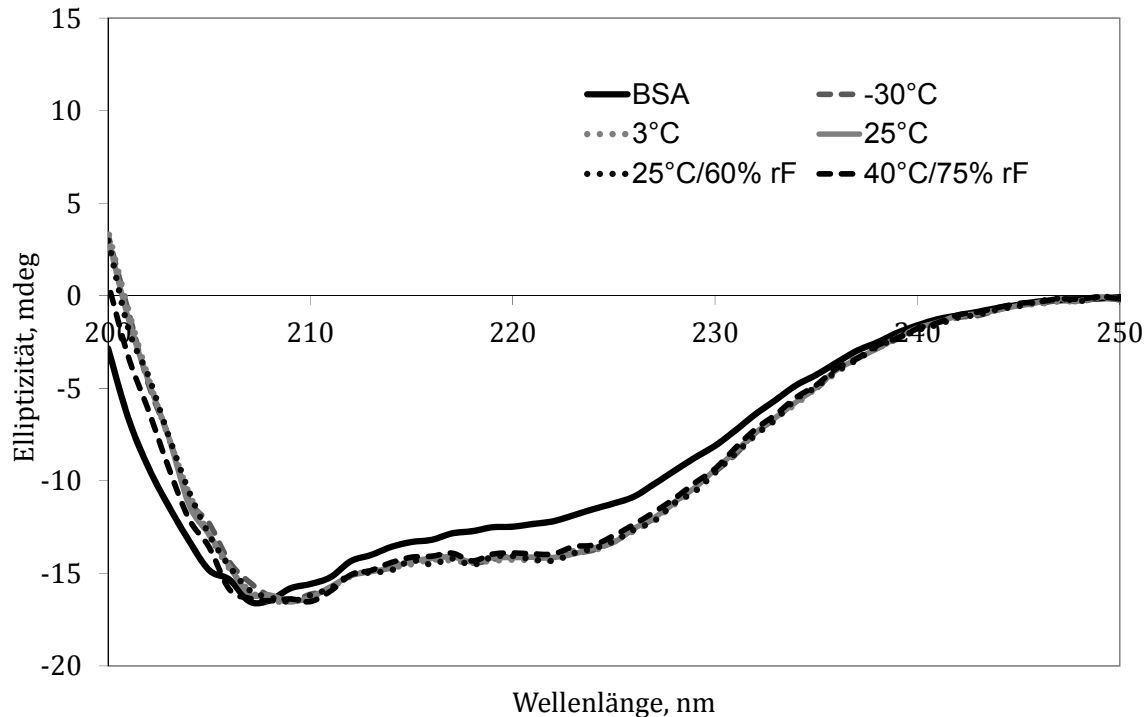


Abbildung 5.28: CD-Spektren von BSA nach einer Lagerzeit von 4 Wochen

Im Gegensatz zum nativen BSA sind bei Chito/BSA HCl nach vier Wochen erste Veränderungen in der SDS-PAGE sichtbar (siehe Abbildung 5.29). Die Banden aller Proben zeigen im Vergleich zur BSA Referenz ein identisches Migrationsmuster, das heißt das Molekulargewicht wurde nicht verändert. Allerdings ist die Bandenintensität der Probe, die bei einer Temperatur von 40°C und einer relativen Luftfeuchte von 75% gelagert wurde, vergleichsweise schwächer, was auf einen verringerten Proteingehalt hindeutet. Die Proteinquantifizierung (siehe Abbildung 5.30) macht deutlich, dass es nach vier Wochen zu einer Verringerung des Proteingehalts um circa 25% gekommen ist. Die übrigen Proben weisen dagegen einen BSA-Gehalt zwischen 85% und 90% auf.

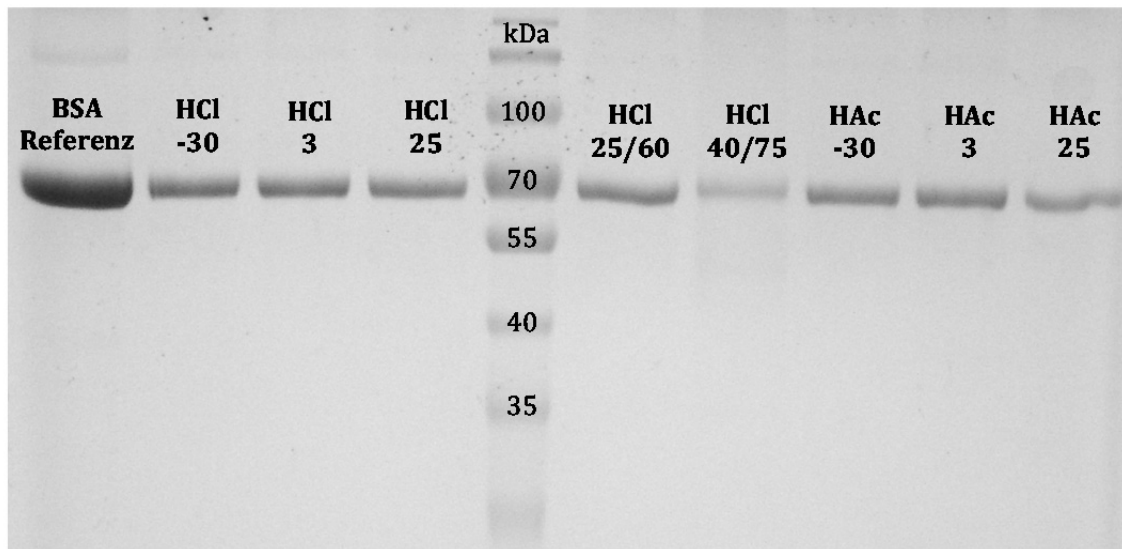


Abbildung 5.29: SDS-PAGE von Chito/BSA HCl und Chito/BSA HAc nach einer Lagerzeit von 4 Wochen

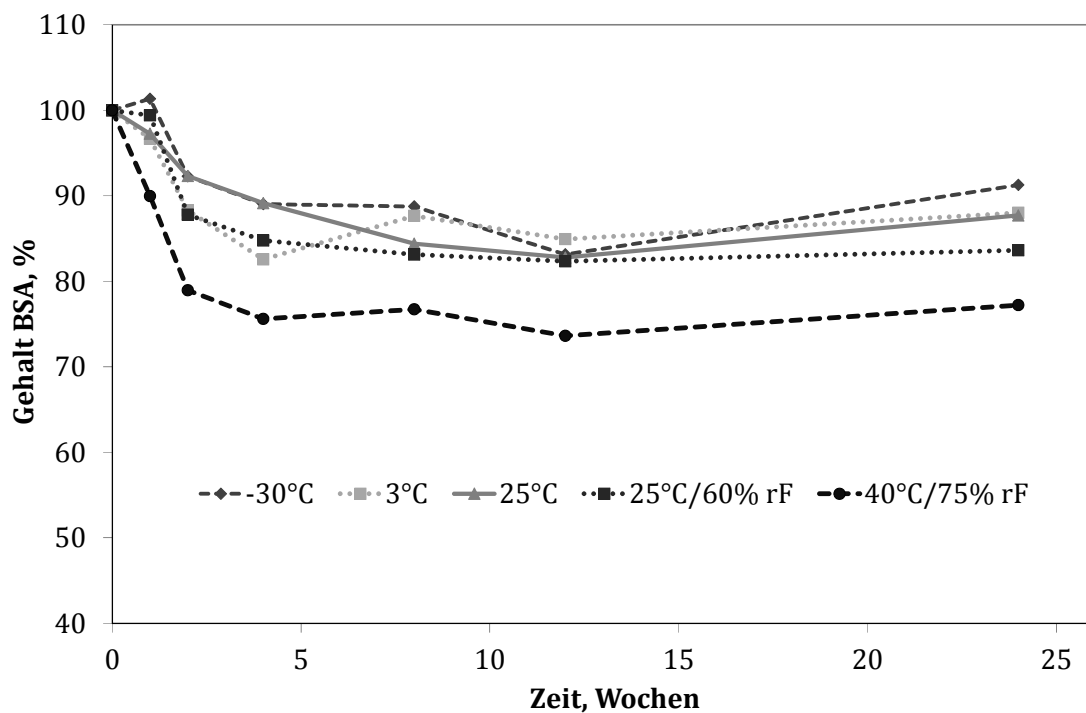


Abbildung 5.30: Proteingehalt von Chito/BSA HCl während einer Lagerzeit von 6 Monaten

Die CD-Spektren von Chito/BSA HCl (Abbildung 5.31) zeigen, dass die Proben sich untereinander und im Vergleich zur BSA Referenz in geringem Ausmaß in ihren Sekundärstrukturen unterscheiden. Allerdings weisen alle

Spektren nach wie vor auf eine überwiegend α -helikale Struktur des Proteins hin.

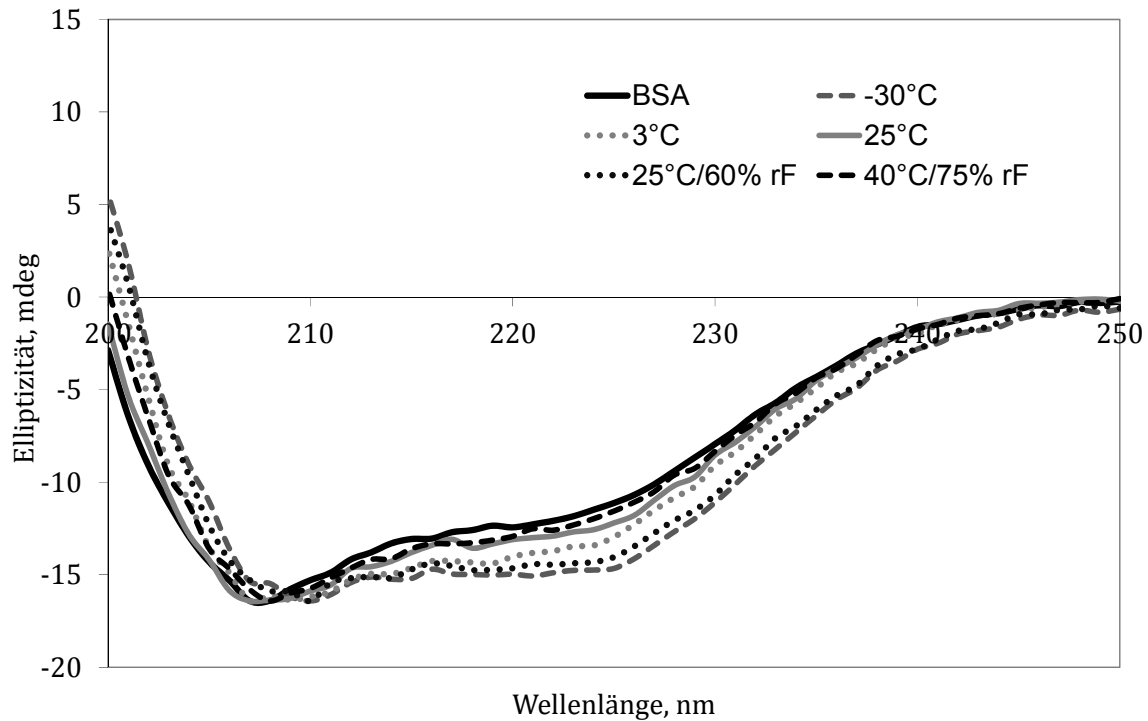


Abbildung 5.31: CD-Spektren von Chito/BSA HCl nach einer Lagerzeit von 4 Wochen

Die SDS-PAGEs von Chito/BSA HAc sind in Abbildung 5.32 und Abbildung 5.35 dargestellt. Im Gegensatz zu den Proben, die aus Salzsäure sprühgetrocknet wurden, zeigen sich bei Chito/BSA HAc keine Veränderungen in der Bandenintensität. Die Molekulargewichte der Proben und der BSA Referenz sind identisch und es sind keine zusätzlichen Banden, die unter anderem auf Proteinfragmente hindeuten würden, sichtbar.

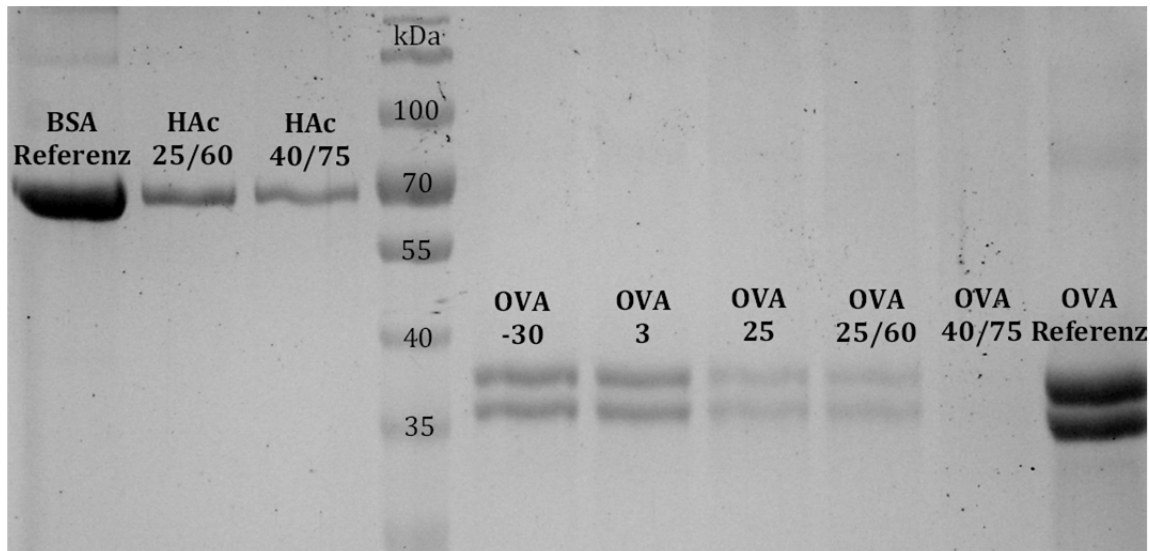


Abbildung 5.32: SDS-PAGE von Chito/BSA HAc und Chito/OVA nach einer Lagerzeit von 4 Wochen

Die Gehaltsbestimmung der gelagerten Proben ist in Abbildung 5.33 dargestellt. Während die Proben, die bei -30°C , 3°C und $25^{\circ}\text{C}/60\%$ rF aufbewahrt wurden, noch einen Gehalt von 85% haben, ist der Proteingehalt der Probe, die bei $40^{\circ}/75\%$ rF gelagert wurde, bereits auf 57% gesunken.

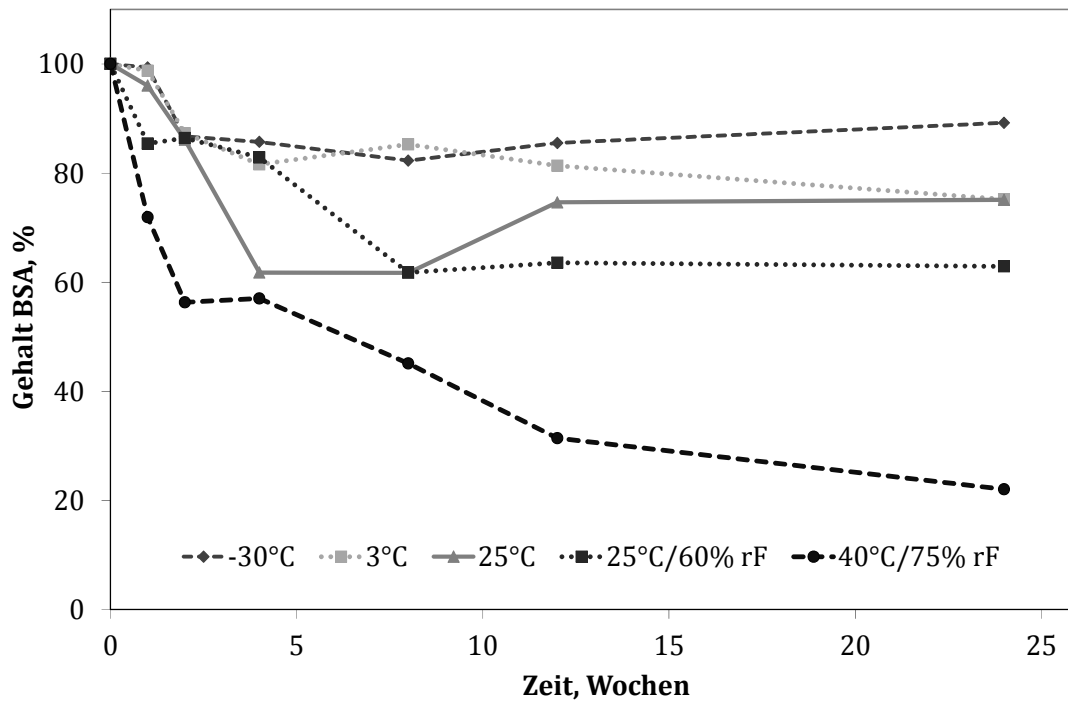


Abbildung 5.33: Proteingehalt von Chito/BSA HAc während einer Lagerzeit von 6 Monaten

Die CD-Spektren, die in Abbildung 5.34 dargestellt sind, zeigen, dass es auch in der Sekundärstruktur der Proben untereinander und im Vergleich zur BSA Referenz nur sehr geringe Unterschiede gibt.

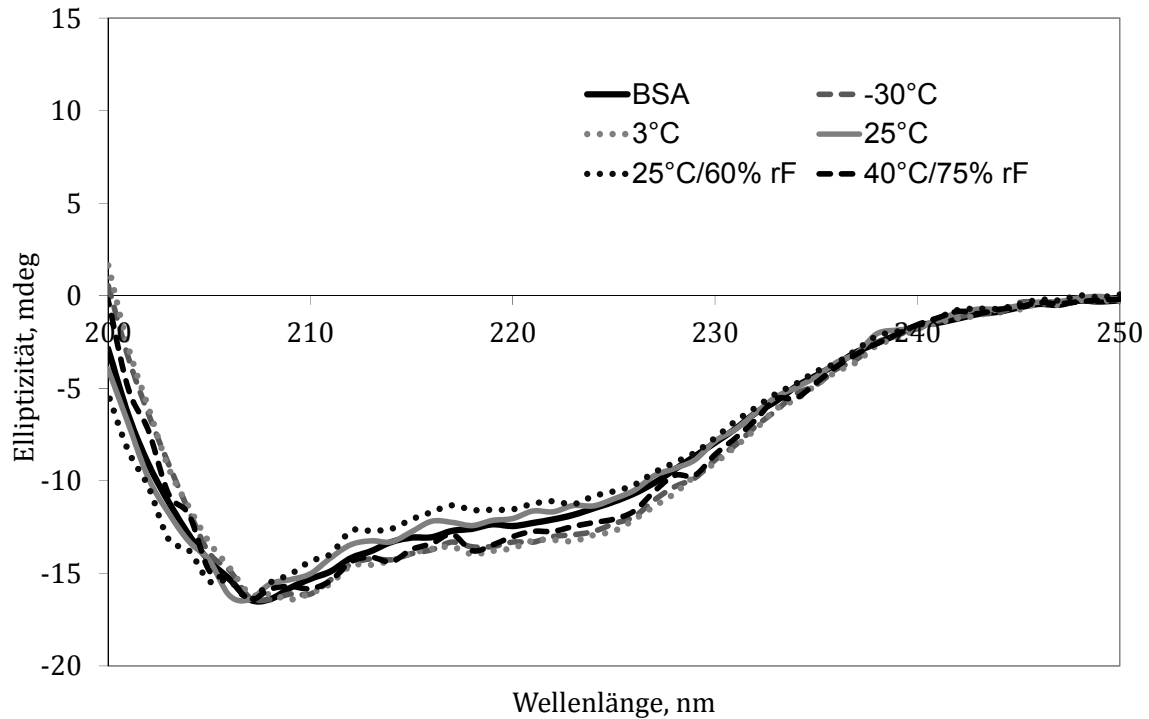


Abbildung 5.34: CD-Spektren von Chito/BSA HAC nach einer Lagerzeit von 4 Wochen

Die SDS-PAGE von nativem OVA nach einer Lagerzeit von vier Wochen ist in Abbildung 5.35 dargestellt. Die Banden der OVA Referenz und der Proben sind identisch und zeigen, dass sich die Primärstruktur, auch bei erhöhter Temperatur und relativer Feuchte, nicht verändert hat.

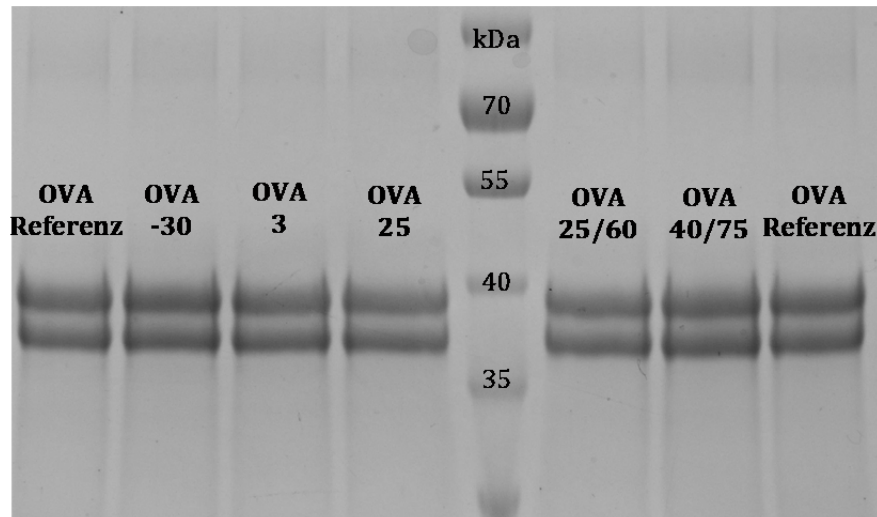


Abbildung 5.35: SDS-Page von OVA nach einer Lagerzeit von 4 Wochen

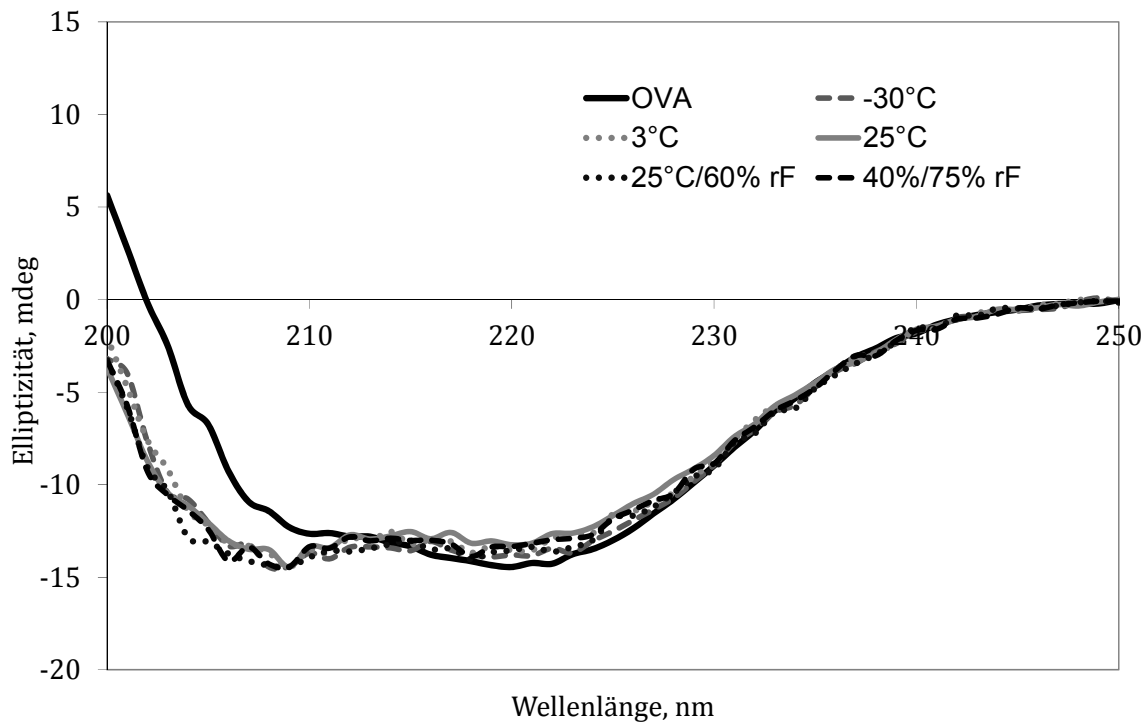


Abbildung 5.36: CD-Spektren von OVA nach einer Lagerzeit von 4 Wochen

Die SDS-PAGE der Chito/OVA-Proben (siehe Abbildung 5.32) zeigt allerdings, dass der Proteingehalt bei Lagerung mit zunehmender Temperatur und relativer Feuchte abnimmt, denn die Bandenintensität verringert sich. Die Probe, die bei 40°C und 75% rF gelagert wurde, weist nach einer Lagerzeit von vier Wochen keine sichtbare Bande mehr auf und

schon nach zwei Wochen war eine verminderte Bandenintensität zu erkennen. Die anderen Proben dagegen zeigten nach zwei Wochen Lagerung noch eine Übereinstimmung der Banden im Vergleich zur OVA Referenz. Die Abnahme des Gehalts der Proben wird durch die Proteinquantifizierung (siehe Abbildung 5.37) bestätigt. Bis auf das bei -30°C gelagerte Chito/OVA, zeigen die Proben nur noch einen OVA-Gehalt zwischen 75% und 80%.

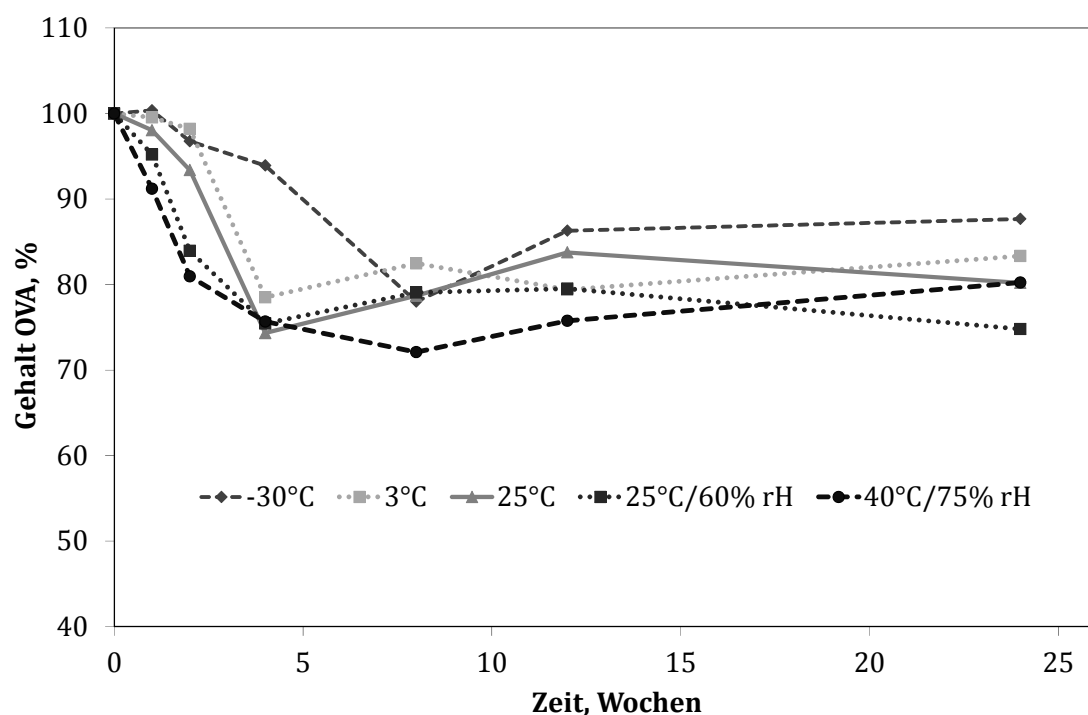


Abbildung 5.37: Proteingehalt von Chito/OVA während einer Lagerzeit von 6 Monaten

Die CD-Spektren der Proben zeigen, dass die Proben, die bei 25°C, 25°C/60% rF und 40°C/75% rF gelagert wurden, nach vier Wochen bereits eine überwiegend ungeordnete Struktur aufweisen. Das heißt, die Menge an OVA, die noch vorhanden war, liegt denaturiert vor. Das Spektrum des Chito/OVA, das bei 40°C/75% rF gelagert wurde, wies auch schon nach zwei Wochen auf eine beginnende Auffaltung des Proteins hin. Die Sekundärstruktur der anderen Proben war dagegen zu diesem Zeitpunkt

noch unverändert. Die CD-Spektren der Chito/OVA-Proben, die gekühlt beziehungsweise gefroren aufbewahrt wurden, sind denen direkt nach der Herstellung sehr ähnlich und zeigen, dass das OVA noch eine eindeutige Sekundärstruktur aufweist.

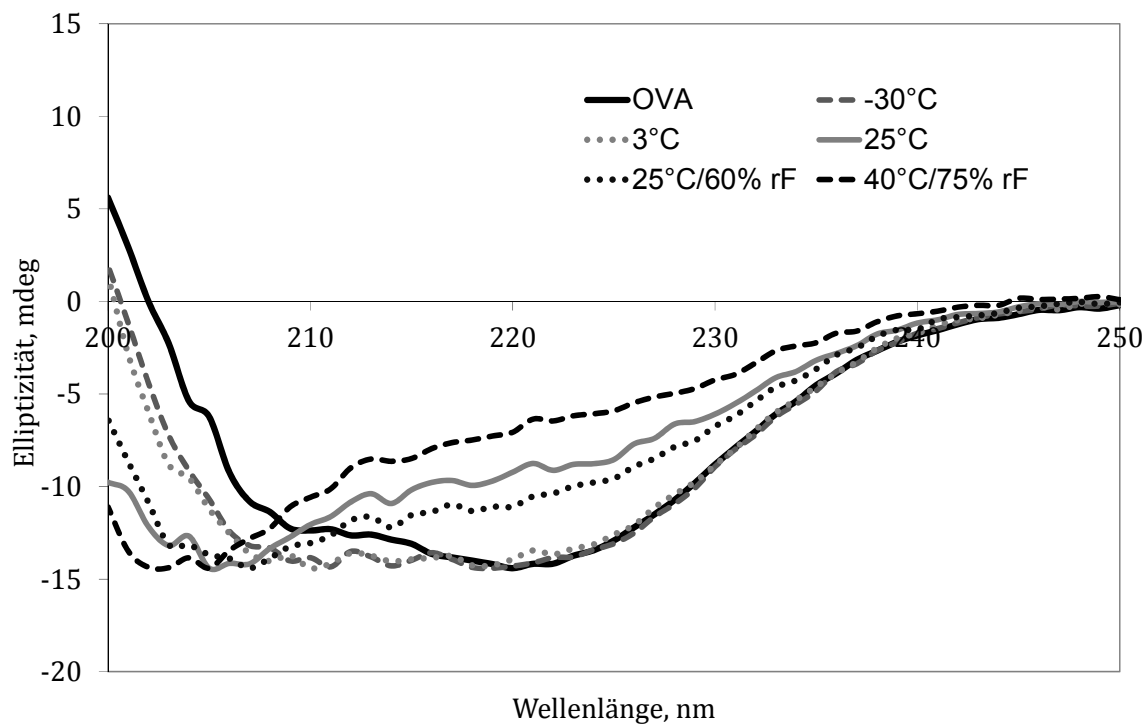


Abbildung 5.38: CD-Spektren von Chito/OVA nach einer Lagerzeit von 4 Wochen

Die vierwöchige Lagerung der nativen Proteine und proteinhaltigen Mikropartikel bei unterschiedlichen Temperatur- und Feuchtebedingungen zeigt, dass die sprühgetrockneten Proben eine gegenüber den nativen Proteinen zum Teil verminderte Stabilität aufweisen. Dies wird besonders deutlich bei den Proben, die bei 40°C/75% rF gelagert wurden. Der Vergleich von Chito/BSA HCl mit Chito/BSA HAc zeigt, dass das Lösungsmittel nur einen geringen Einfluss auf den Gehalt und die Sekundärstruktur von BSA hat. Außerdem wurde bereits nach vier Wochen Lagerung deutlich, dass OVA, welches in den Mikropartikeln eingebettet

war, verglichen mit nativem OVA und Chito/BSA eine geringere Stabilität aufweist.

5.4.4 Sechs Monate

5.4.4.1 Proteinstabilität

Nach Lagerung der Mikropartikel und der nativen Proteine über eine Dauer von sechs Monaten wurden die letzten Proben gezogen. Die SDS-PAGE des nativen BSAs ist in Abbildung 5.39 dargestellt und verdeutlicht, dass es auch nach einer Lagerung des Proteins über sechs Monate nicht zu einer Veränderung des Molekulargewichts gekommen ist. Die Primärstruktur des BSAs bleibt auch nach Lagerung bei erhöhter Temperatur und Luftfeuchte erhalten.

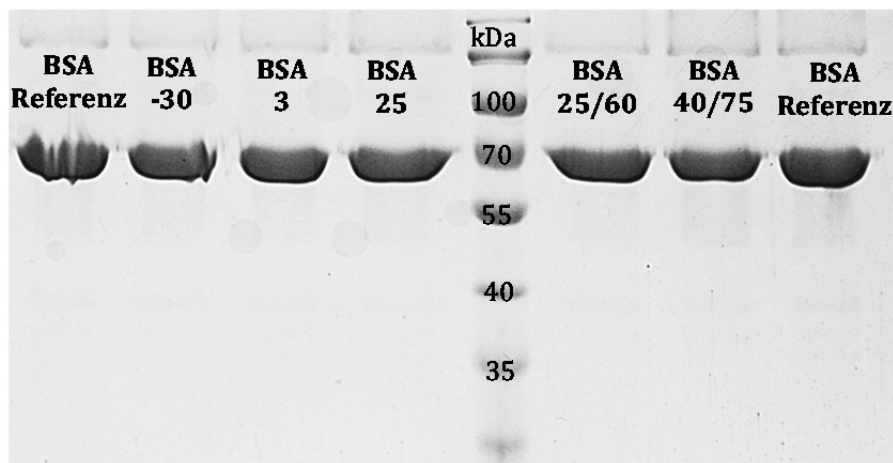


Abbildung 5.39: SDS-PAGE von BSA nach einer Lagerzeit von 6 Monaten

Die CD-Spektren der Proben (siehe Abbildung 5.40) sind auch nach einem Zeitraum von sechs Monaten noch identisch und unterscheiden sich nur in geringem Ausmaß von der BSA Referenz. Das heißt, die Sekundärstruktur des BSAs wurde durch die Lagerung nur geringfügig verändert.

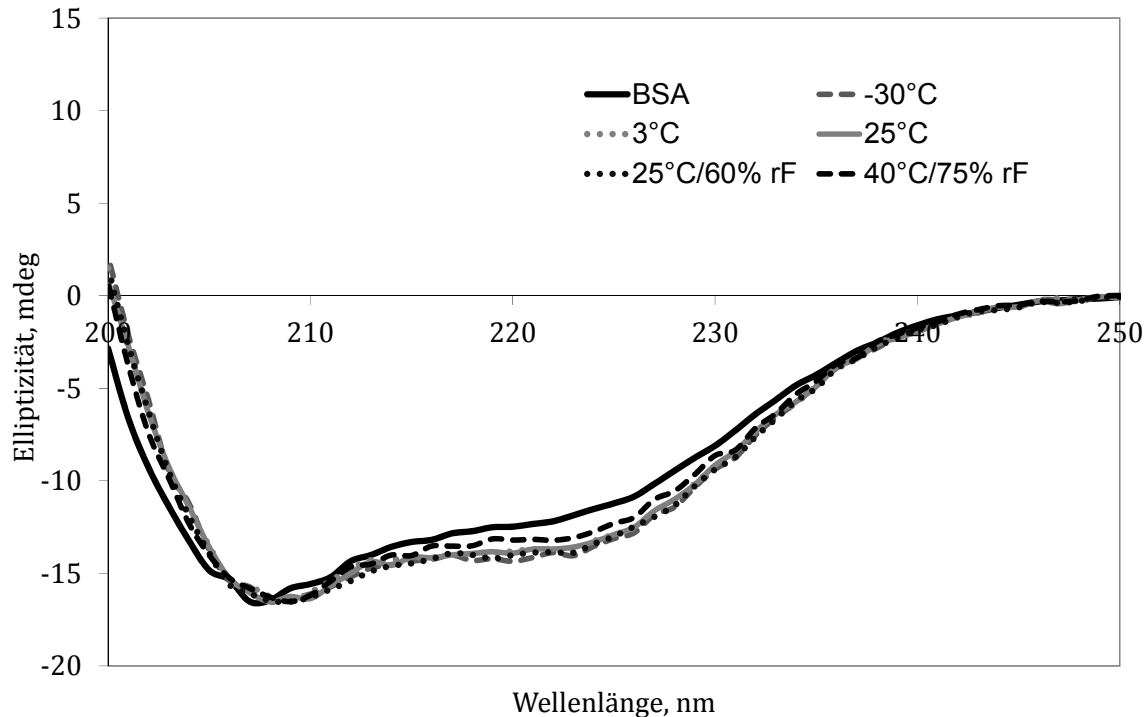


Abbildung 5.40: CD-Spektren von BSA nach einer Lagerzeit von 6 Monaten

Die SDS-PAGE von Chito/BSA HCl (siehe Abbildung 5.41) zeigt, dass die Banden der Proben mit der BSA Referenz übereinstimmen. Allerdings hat die Bandenintensität der Probe, die bei 40°C/75% rF gelagert wurde, im Vergleich zur SDS-PAGE nach vier Wochen noch weiter abgenommen. Außerdem zeigen auch die Proben, die bei 25°C und 25°C/60% rF gelagert wurden, eine beginnende Abnahme der Färbungsintensität. Der Proteingehalt von Chito/BSA HCl, das bei 40°C/75% rF gelagert wurde, war bereits nach vier Wochen auf 75% gesunken (siehe Abbildung 5.30). Allerdings kam es über den restlichen Zeitraum von fünf Monaten nicht zu einer weiteren Abnahme, sondern der BSA-Gehalt blieb konstant. Im Vergleich zu den anderen Proben zeigt sich bei dieser Probe, dass der Verlust an Protein bei erhöhter Temperatur und Luftfeuchte bis zu 10% größer ist als unter den anderen Lagerbedingungen.

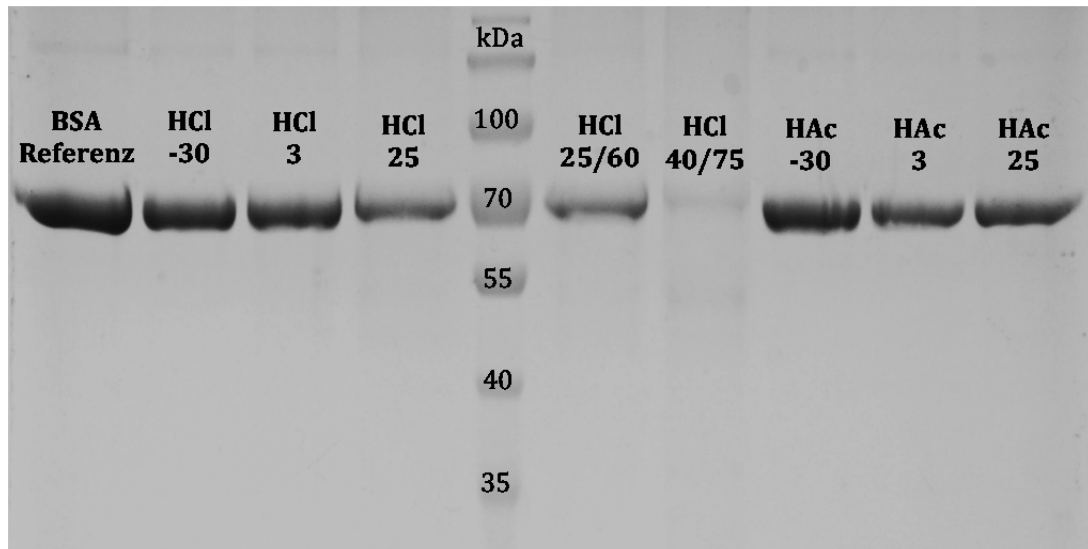


Abbildung 5.41: SDS-PAGE von Chito/BSA HCl und Chito/BSA HAc nach einer Lagerzeit von 6 Monaten

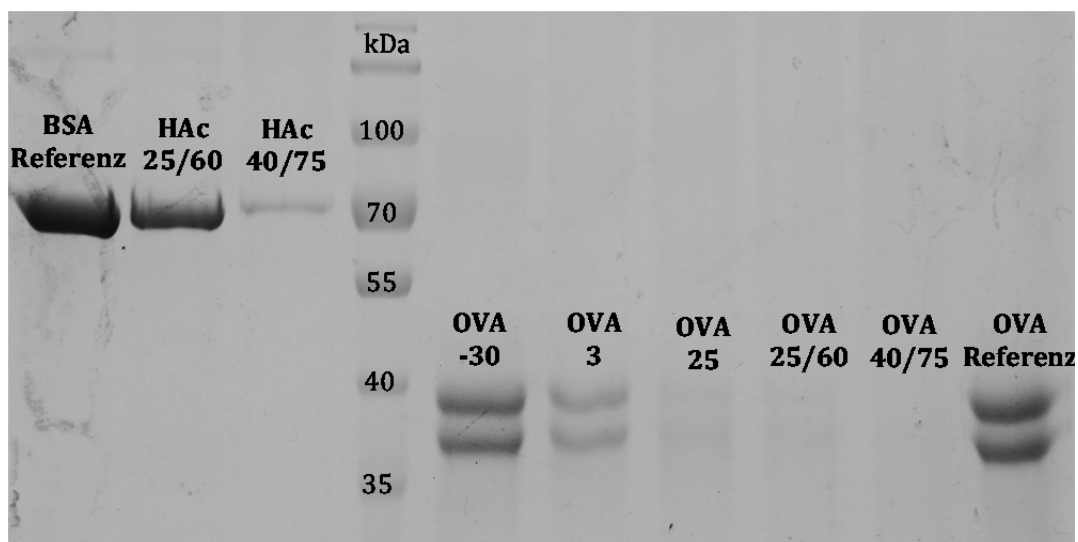


Abbildung 5.42: SDS-PAGE von Chito/BSA HAc und Chito/OVA nach einer Lagerzeit von 6 Monaten

Die CD-Spektren von Chito/BSA HCl sind in Abbildung 5.43 dargestellt. Die Proben zeigen untereinander eine identische Sekundärstruktur, die nach wie vor durch den Anteil an α -Helix geprägt ist. Die Spektren der Proben unterscheiden sich im Vergleich zum Spektrum der BSA Referenz nur geringfügig, das heißt, dass auch nach sechs Monaten die Sekundärstruktur der verbliebenen Menge an BSA nur wenig verändert wurde.

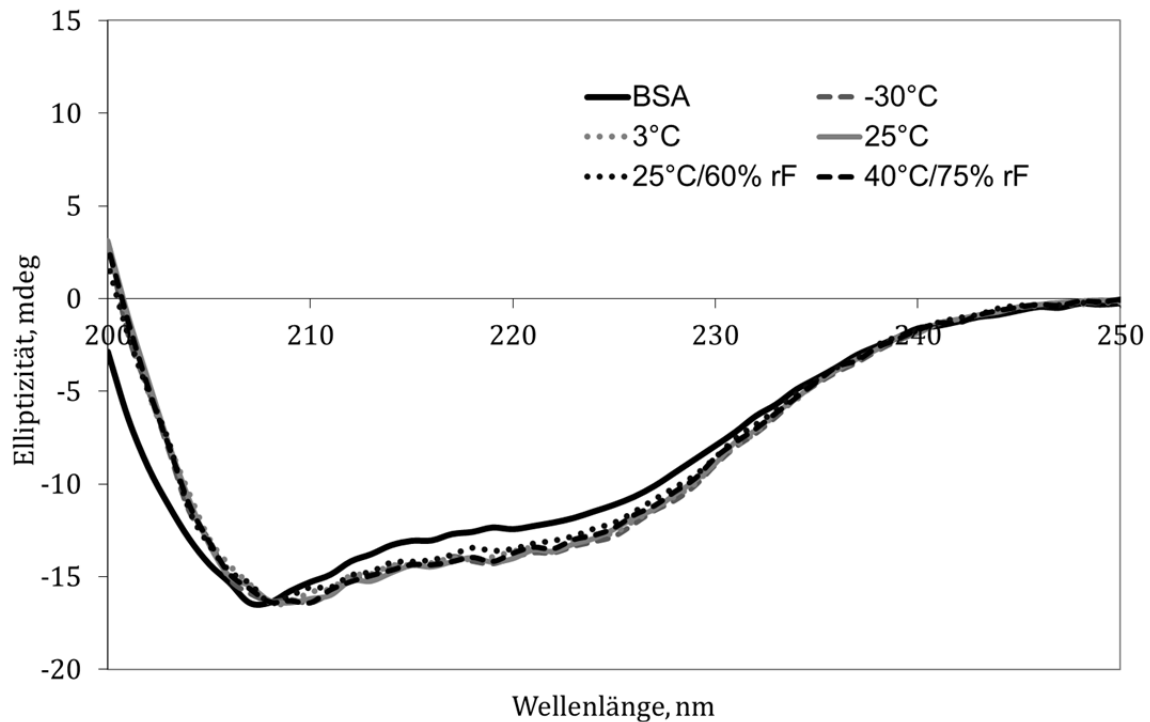


Abbildung 5.43: CD-Spektren von Chito/BSA HCl nach einer Lagerzeit von 6 Monaten

Die SDS-PAGEs von Chito/BSA HAc sind in Abbildung 5.41 und Abbildung 5.42 dargestellt. Die Banden der Proben stimmen mit der Bande der BSA Referenz überein, was auf eine intakte Primärstruktur hindeutet. Allerdings zeigt sich nach einer Lagerzeit von sechs Monaten, dass die Bandenintensität der Probe, die bei 40°C/75% rF gelagert wurde, schwächer geworden ist. Der Proteingehalt nach vier Wochen Lagerung lag nur noch bei 57% und hat über den sich anschließenden Zeitraum von fünf Monaten weiter kontinuierlich abgenommen. Nach sechs Monaten betrug der BSA-Gehalt nur noch 20%. Auch die Probe, die bei 25°C/60% rF gelagert wurde, zeigt einen deutlich erniedrigten Proteingehalt, der nach zwei Monaten konstant bei 62% lag.

Die Sekundärstruktur des verbliebenen BSAs in den Proben ist während der Lagerung von sechs Monaten weitgehend unverändert geblieben (siehe Abbildung 5.44). Auch der Vergleich der Spektren der Proben mit dem

Referenzspektrum zeigt, dass die Veränderungen in der Sekundärstruktur vergleichsweise gering sind.

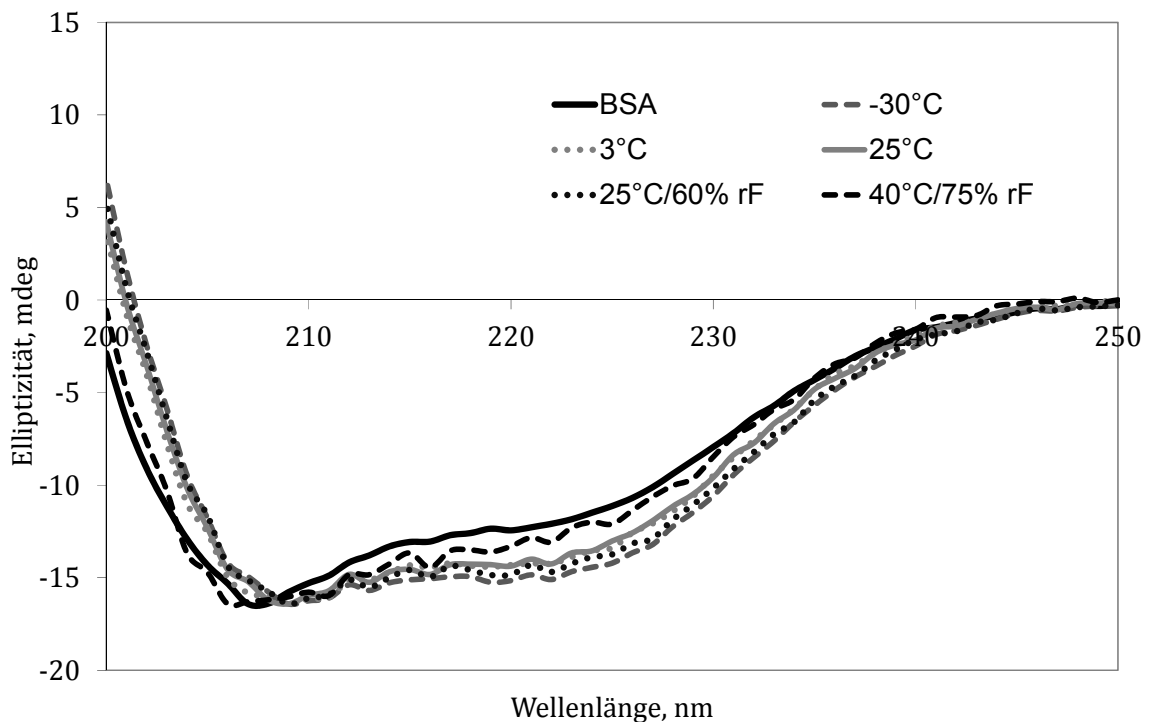


Abbildung 5.44: CD-Spektren von Chito/BSA HAC nach einer Lagerzeit von 6 Monaten

Die SDS-PAGE des nativen OVAs sind in Abbildung 5.45 dargestellt. Auch nach einer Lagerzeit von sechs Monaten zeigen sich keine Veränderungen des Molekulargewichts und der Primärstruktur des Proteins. Allerdings weist das CD-Spektrum der Probe (siehe Abbildung 5.46), die bei 40°C/75% rF gelagert wurde, auf eine beginnende Auffaltung des Proteins und damit Denaturierung hin. Die übrigen Proben dagegen sind in ihrer Sekundärstruktur, verglichen mit den Proben nach vier Wochen, weiterhin unverändert.

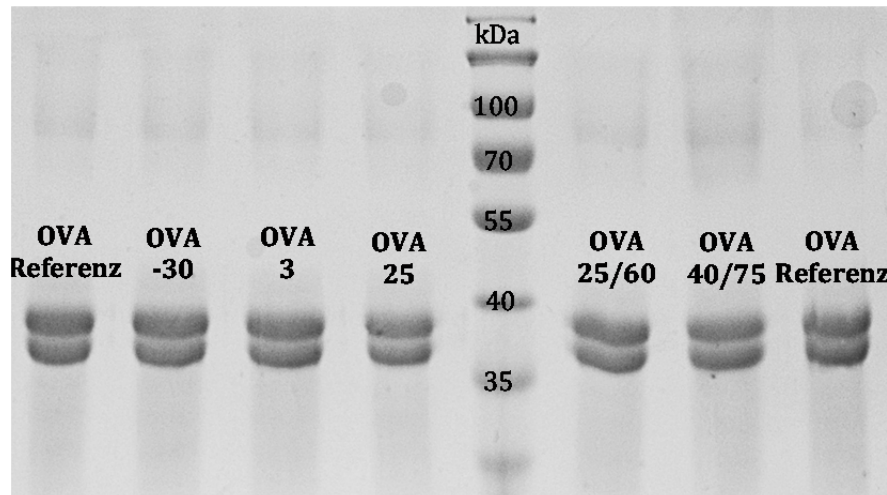


Abbildung 5.45: SDS-PAGE von OVA nach einer Lagerzeit von 6 Monaten

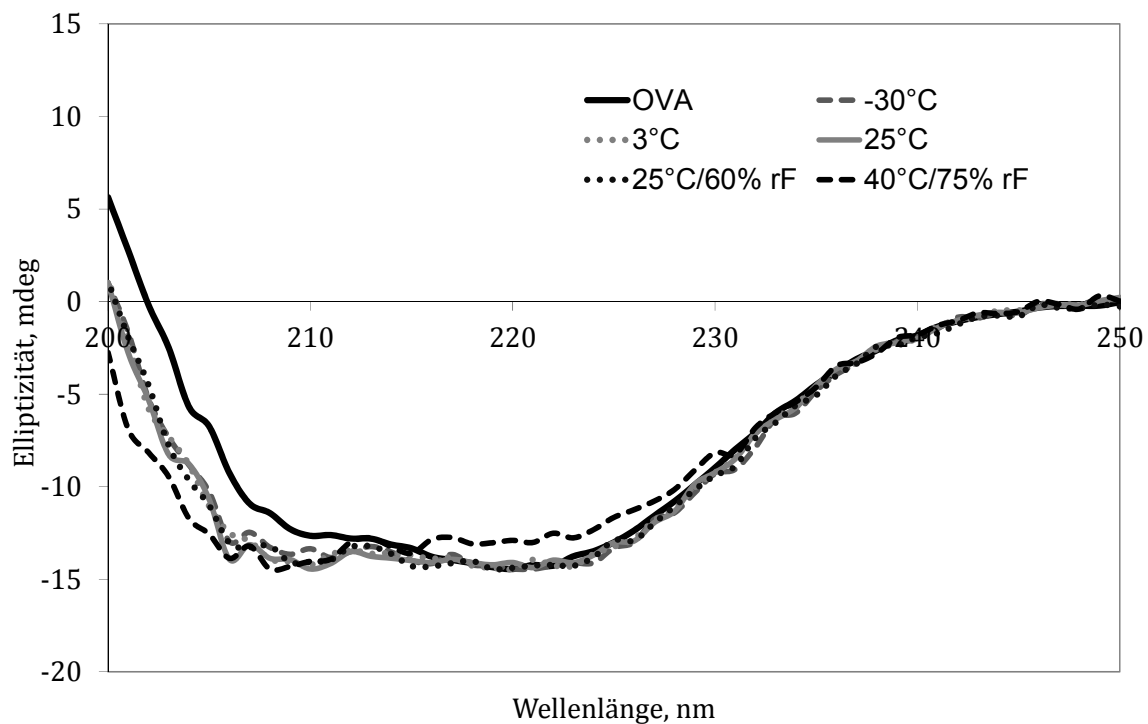


Abbildung 5.46: CD-Spektren von OVA nach einer Lagerzeit von 6 Monaten

Die SDS-PAGE von Chito/OVA ist in Abbildung 5.42 dargestellt und weist für die Proben, die bei -30°C und 3°C gelagert wurden, deutlich sichtbare Banden auf, die mit der Bande der OVA Referenz übereinstimmen. Die Bandenintensität der übrigen Proben hat dagegen abgenommen. Der Proteingehalt der Proben lag nach einer Lagerzeit von sechs Monaten

zwischen 75% und 85% (siehe Abbildung 5.37) und hat in den ersten zwei Monaten stärker abgenommen als in dem darauffolgenden Zeitraum.

Die CD-Spektren, welche in Abbildung 5.47 dargestellt sind, zeigen, dass lediglich die Probe, die bei -30°C gelagert wurde, noch eine Sekundärstruktur aufweist. Das OVA der übrigen Proben ist bereits denaturiert und liegt ungeordnet vor.

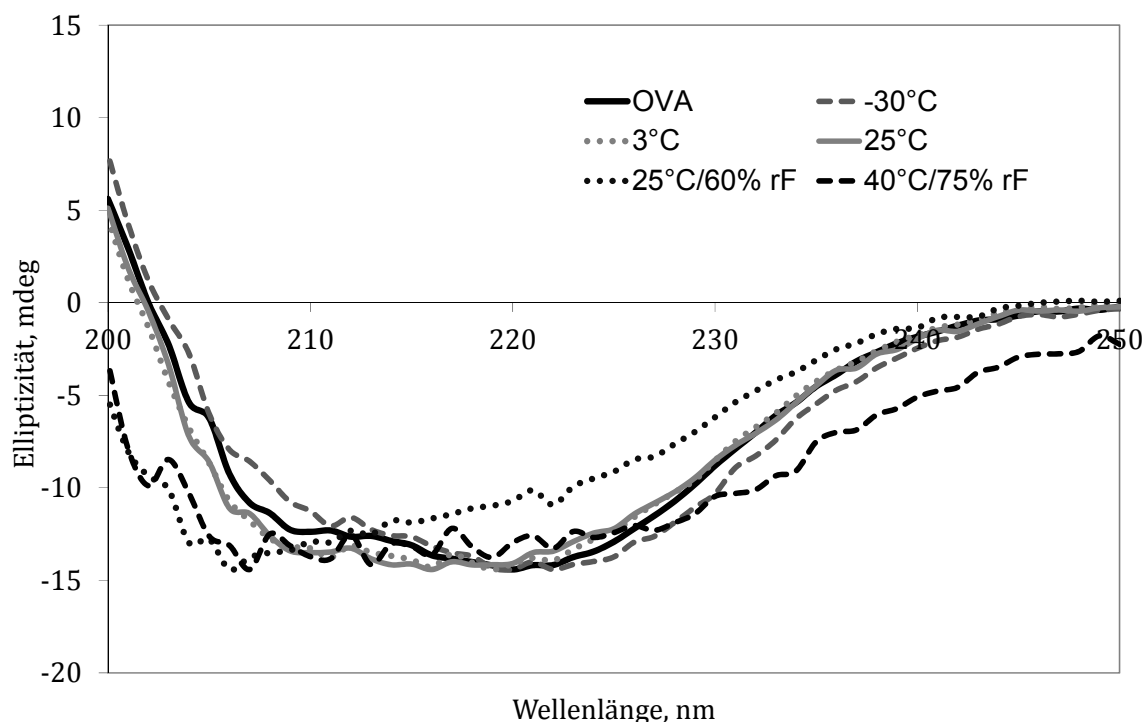


Abbildung 5.47: CD-Spektren von Chito/OVA nach einer Lagerzeit von 6 Monaten

Die Untersuchungen zur Lagerstabilität der Proteine über einen Zeitraum von sechs Monaten zeigen, dass die Proteine, die in die Mikropartikel eingebettet waren, im Vergleich zu den nativen Proteinen eine geringere Stabilität aufweisen. Dies deutete sich bereits nach einer Lagerung von vier Wochen an. Besonders die Proben, die bei 40°C/75% rF gelagert wurden, weisen einen deutlich erniedrigten Proteingehalt auf. Dies ist besonders auffällig bei Chito/BSA HAc, denn bei dieser Probe nahm der Proteingehalt kontinuierlich über den gesamten Lagerungszeitraum ab. Im Vergleich der

beiden Proteine untereinander zeigte sich, dass OVA eine geringere Lagerstabilität und höhere Denaturierungstendenz aufweist als BSA (siehe Abschnitt 5.4).

Da während des Herstellungsprozesses zum Lösen des Chitosans Essig- beziehungsweise Salzsäure verwendet wurde, enthalten auch die Mikropartikel nach der Sprühtrocknung noch freie Säuremoleküle und haben außerdem einen Wassergehalt von 6-8%. Daher entstehen während der Lagerung, gerade auch bei erhöhten Luftfeuchten, wieder geringe Mengen an Essig- beziehungsweise Salzsäure und als Folge wird das Protein hydrolytisch gespalten. Wie bereits beschrieben, wird das OVA-Molekül bei niedrigem pH-Wert flexibler und damit anfälliger gegenüber Proteolyse und Denaturierung. Daher zeigt Chito/OVA gegenüber Chito/BSA eine geringere Proteinstabilität. Der Vergleich der beiden verwendeten Lösungsmittel, die zur Herstellung von Chito/BSA verwendet wurden, zeigt sich, dass Chito/BSA HCl über den sechsmonatigen Lagerzeitraum eine bessere Stabilität des Proteingehalts aufweist. Alle Proben, bis auf diejenige, die bei 40°C/75% rF gelagert wurde, zeigen einen Proteingehalt von mindestens 85%. In Bezug auf die Stabilität ist daher die Verwendung von verdünnter Salzsäure zur Herstellung der Mikropartikel vorteilhafter. Außerdem sollten die Mikropartikel in luftdichten Gefäßen beziehungsweise Packmitteln aufbewahrt werden, damit es nicht zu einer Aufnahme von Luftfeuchtigkeit aus der Umgebung kommen kann. So kann auch die Gefahr der Denaturierung durch Hydrolyse reduziert werden.

5.4.4.2 Nasale Deposition

Nach einer Lagerzeit von sechs Monaten wurde neben der Proteinstabilität auch die nasale Deposition der gelagerten Chitosan-Mikropartikel (Chito/BSA HCl) untersucht. Die Probe, die bei 40°C/75% rF gelagert wurde, wurde von den Untersuchungen ausgenommen, da die

Proteinstabilität nicht gegeben war. Die Depositionsprofile der Bestimmungen bei 0 l/min sind in Abbildung 5.48 dargestellt.

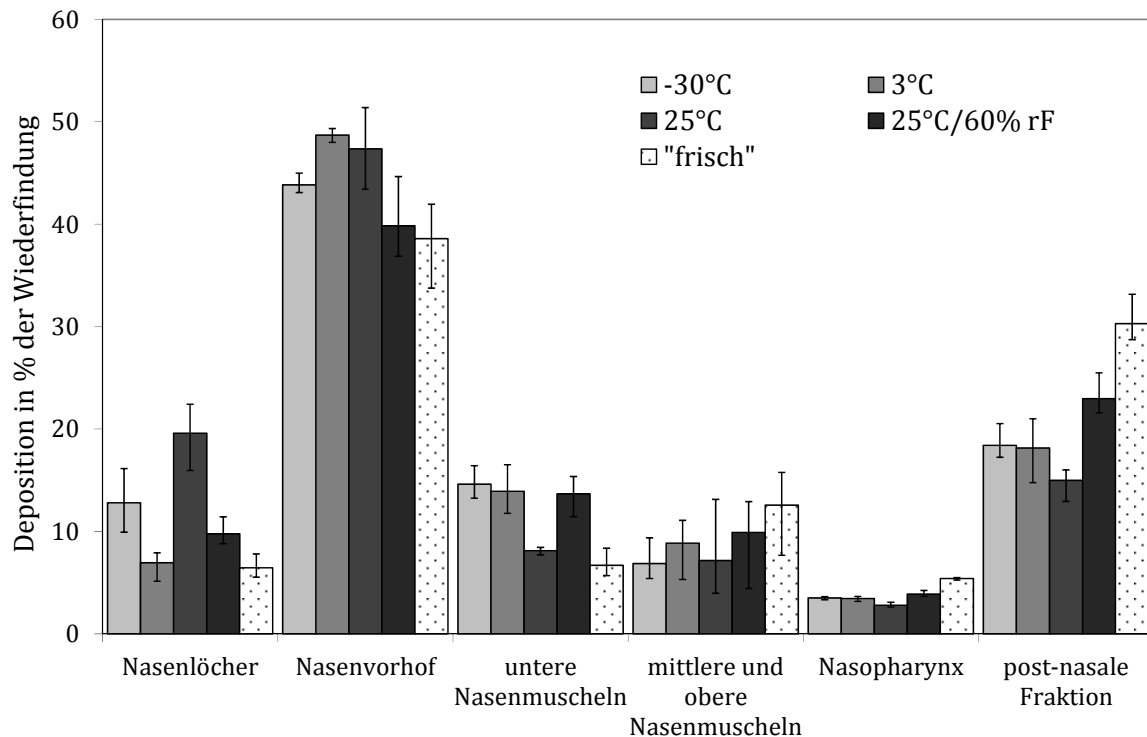


Abbildung 5.48: Depositionsprofile von Chito/BSA HCl nach sechsmonatiger Lagerung im Vergleich zum Depositionsprofil der Mikropartikel direkt nach der Herstellung ("frisch")

Im Vergleich zu den Mikropartikeln direkt nach der Herstellung („frisch“) zeigen die gelagerten Mikropartikel eine geringere post-nasale Fraktion. Dies wird besonders bei der Probe deutlich, die bei 25°C und Umgebungsfeuchte gelagert wurde. In diesem Fall beträgt die post-nasale Fraktion nur noch 15 %, während der nicht nasal abgeschiedene Anteil der übrigen Proben zwischen 18% und 23% liegt. Die abgeschiedene Proteinmenge in den Nasenlöchern, im Nasenvorhof und in den unteren Nasenmuscheln ist im Vergleich zu den „frischen“ Mikropartikeln höher. Die Deposition im Nasopharynx ist dagegen vergleichbar. Durch die Lagerung, besonders bei erhöhten Luftfeuchten, neigen die Proben zur Aufnahme von Wasser aus der Umgebung. Dies führt zur Bildung von

Agglomeraten, welche durch die Dispergierung mit dem PowderJet nicht zerstört werden. Die im Vergleich zu den „frischen“ Mikropartikeln größeren Agglomerate werden daher vermehrt in den vorderen Bereichen der Nasenkavität abgeschieden, was zu einer Linksverschiebung der Depositionsprofile führt.

5.5 Zusammenfassung

Durch Sprühtrocknung lassen sich Protein-beladene Mikropartikel aus Chitosan schnell und unkompliziert herstellen. Die Mikropartikel weisen eine Partikelgröße im unteren Mikrometerbereich auf und daher sollte eine partikuläre Aufnahme durch zum Beispiel M-Zellen des nasalen Lymphoidgewebes möglich sein. Aufgrund der geringen Partikelgröße ist allerdings eine gleichmäßige Dosierung mit Hilfe des reservoirbasierten PowderJets nicht möglich, da das Pulver sehr kohäsiv ist und schlechte Fließeigenschaften besitzt. Außerdem zeigen die Depositionsprofile, dass auch ohne simulierten Einatemstrom nur 70% der Mikropartikel in der Nasenkavität abgeschieden werden, was zu einer hohen post-nasalen Fraktion von 30% führt. Durch das Mischen der Mikropartikel mit größeren Trägerpartikeln können die Dispergierfähigkeit und die nasale Deposition dagegen deutlich verbessert werden. Unter den verwendeten Trägermaterialien wiesen dabei die Mischungen mit Pearlitol 200 SD, einer sprühgranulierten und daher oberflächenrauen Qualität, die besten Ergebnisse auf. Diese Pulvermischungen zeigten Gleichförmigkeit in der abgegebenen Dosis mit dem PowderJet und gegenüber den „reinen“ Mikropartikeln signifikant reduzierte post-nasale Fraktionen sowohl bei den Bestimmungen ohne als auch bei denen mit simuliertem Einatemstrom. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die nasale Deposition nicht nur von der Formulierung, sondern auch von der verwendeten

Applikationshilfe abhängig ist. Während die Depositionsprofile bei Verwendung des PowderJets zufriedenstellend sind, konnte die Deposition bei Verwendung des Powder UDS noch verbessert werden und die Depositionsprofile entsprechen annähernd dem idealen Profil.

Die Untersuchungen der Proteinstabilität ergaben, dass durch die Sprühtrocknung das Molekulargewicht der Proteine erhalten bleibt und die Sekundärstruktur nur in geringem Ausmaß verändert wird. Die Lagerung der Mikropartikel führte in allen Fällen zu einer Reduzierung des Proteingehalts, was besonders bei den Proben zu beobachten war, die bei 40°/75% rF gelagert wurden. Der Proteingehalt der Mikropartikel, die aus verdünnter Salzsäure sprühgetrocknet wurden, betrug nach einer Lagerung von sechs Monaten noch mindestens 85%, mit Ausnahme der bei 40°C/75% rF gelagerten Probe (75%). Die Sekundärstruktur des verbliebenen BSAs wurde während der Lagerzeit dagegen nur geringfügig verändert. Im Gegensatz zu BSA zeigt OVA eine geringere Lagerstabilität. Der Proteingehalt liegt nach einer Lagerdauer von sechs Monaten zwischen 70 und 85% und eine deutliche Sekundärstruktur war nur bei den Proben nachweisbar, die bei -30°C und 3°C gelagert wurden. Insgesamt ist die Proteinstabilität der Mikropartikel vor allem bei erhöhter Temperatur und Luftfeuchte noch nicht zufriedenstellend. Um einer Denaturierung durch Hydrolyse vorzubeugen, sollten die Mikropartikel luftdicht verpackt aufbewahrt werden, damit es nicht zu einer Aufnahme von Feuchtigkeit kommt. Für eine weitergehende Optimierung der Formulierung sollten alternative Methoden für die Herstellung von Mikropartikeln, wie die ionische Gelierung, evaluiert oder die Wahl eines alternativen matrixbildenden Polymers in Betracht gezogen werden.

Die Ergebnisse der Charakterisierung der Pulvermischungen zeigen, dass durch die Adhäsion der Mikropartikel an größere Trägerpartikel die nasale Deposition und die Dispergierbarkeit mit dem PowderJet modifiziert werden können. Dabei führten die Pulvermischungen mit Pearlitol 200 SD zu den besten Ergebnissen.

6 Nanopartikuläre Formulierungen

6.1 Einleitung

Nanopartikel werden immer häufiger als Trägersysteme für Antigene in der nasalen Vakzinierung eingesetzt und bieten viele Vorteile gegenüber herkömmlichen Impfstoffformulierungen wie Lösungen oder Suspensionen. Durch den Einschluss von Antigenen in Nanopartikel können diese zum Teil sehr empfindlichen Biomoleküle vor Denaturierung geschützt (Pérez et al., 2002) und der Transport der Antigene durch die nasale Mukosa erleichtert werden (Csaba et al., 2006). Partikel, die eine Größe im Nanometerbereich aufweisen und daher der Größe von Viren und kleineren Bakterien entsprechen, können zum einen durch M-Zellen (siehe Kapitel 2.3), zum anderen aber auch durch Epithelzellen und im Epithel verteilte dendritische Zellen via Endozytose aufgenommen werden (Chadwick et al., 2010). Werden Antigen-beladene Nanopartikel nach dem Transport durch die mukosale Membran endozytotisch von Immunzellen aufgenommen, wird nach Prozessierung des Antigens nicht nur eine systemische, sondern auch eine lokale Immunantwort ausgelöst, die in der Sezernierung von sIgA-Antikörpern resultiert. Ausführlich werden diese immunologischen Aspekte in Abschnitt 2.3.2.1 diskutiert.

Aufgrund der Fähigkeit Immunreaktionen zu verstärken, dienen nanopartikuläre Trägersysteme zusätzlich auch als Adjuvans. Csaba et al. (2009) haben die Vorteile dieser Systeme in Bezug auf die adjuvante Wirkung zusammengefasst: (I) Nanopartikel können effektiv die Antigenmenge, die das Immunsystem erreicht, erhöhen. (II) Durch die Gabe von Nanopartikeln kann die Freisetzung des Antigens kontrolliert werden. Dadurch steht das Antigen über einen längeren Zeitraum zur Verfügung

und auch die Immunreaktion dauert länger an. (III) Nanopartikuläre Systeme vereinen die Aufgaben von Antigenadministration und -transport mit adjuvanten Effekten wie Immunmodulation beziehungsweise –stimulation.

Die Herstellung von bioabbaubaren, Antigen-beladenen Nanopartikeln kann auf unterschiedlichste Weise erfolgen. Die Auswahl des Herstellungsverfahrens richtet sich dabei nach den Eigenschaften, wie zum Beispiel Löslichkeit oder Ladung, des verwendeten Polymers. Für die Herstellung von nanopartikulären Trägersystemen für die nasale Vakzinierung werden häufig Chitosan und Chitosanderivate (zum Beispiel N-Trimethylchitosan, Amidi et al., 2006) eingesetzt. Chitosan liegt in leicht saurer Lösung positiv geladen vor und bildet nach Zugabe von negativ geladenen Gegenionen durch Ladungsausgleich spontan Nanopartikel. Dieser Vorgang wird auch als ionische Gelierung bezeichnet. Als Gegenionen können unter anderem Tripolyphosphat (Fernandez-Urrusuno et al., 1999; Calvo et al., 1997) und Dextransulfat (Sharma et al., 2012) eingesetzt werden. Vorteilhaft ist, dass es sich bei der ionischen Gelierung um eine sehr schonende Methode handelt, da sie ohne organische Lösungsmittel und erhöhte Temperaturen auskommt (Amidi et al., 2006).

Eine weitere Methode, die beispielsweise für die Herstellung von Nanopartikeln aus Polymilchsäure (PLA) beziehungsweise Polylaktid-co-glycolid (PLGA) geeignet ist, stellt die „emulsification/solvent evaporation“ dar (Pinto Reis et al., 2006). Zunächst wird das Polymer in einem organischen Lösungsmittel gelöst. Aus dieser Polymerlösung und stabilisatorhaltigem Wasser wird durch Energieeintrag eine O/W-Emulsion hergestellt und anschließend das organische Lösungsmittel abgedampft. Als Folge der verringerten Löslichkeit fallen je nach vorheriger Tröpfchengröße Mikro- oder Nanopartikel aus.

Des Weiteren können Nanopartikel auch durch Nanopräzipitation oder Aussalzen hergestellt werden (Quintanar-Guerrero et al., 1998). In beiden Fällen wird das Polymer in einem mit Wasser mischbaren Lösungsmittel (zum Beispiel Ethanol oder Aceton) gelöst. Bei der Nanopräzipitation, auch „solvent displacement“ genannt, wird die Lösung dann unter Rühren in Wasser gegeben und die Nanopartikel bilden sich spontan. Beim Aussalzen erfolgt die Nanopartikelbildung durch die Zugabe von Elektrolyten.

In der vorliegenden Arbeit wurden OVA-beladene Nanopartikel aus Agarose hergestellt. Agarose ist ein Biopolymer, das biokompatibel, inert und hydrophil ist und sich daher als Trägersystem eignet (siehe Abschnitt 3.2.2). Wang und Wu (1997) haben bereits eine mögliche Herstellungsmethode von Agarose-Nanopartikel beladen mit OVA beschrieben. Die Nanopartikel wurden in diesem Fall durch eine Emulsionsbasierte Methode hergestellt. Dafür wurde Agarose unter Zuführung von Wärme in Phosphatpuffer gelöst und mit dem zu verkapselndem OVA versetzt. Aus dieser wässrigen Phase wurde dann zusammen mit Maiskeimöl unter Homogenisation eine W/O-Emulsion hergestellt. Durch Kühlung wurde die Emulsion in eine Suspension überführt, da Agarose bei Unterschreiten der Gelbildungstemperatur vom Sol- in den Gelzustand übergeht und fest wird. Die Nanosuspension wurde anschließend mit Heptan verdünnt und die Nanopartikel abfiltriert. Da diese Methode sehr aufwendig und nicht immer zielführend ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine weitere Methode zur Herstellung von Protein-beladenen Agarose-Nanopartikeln entwickelt. Aus der Nanosuspension wurde weiterführend eine nanopartikuläre Vakzinformulierung entwickelt und anschließend charakterisiert.

6.2 Herstellung der Nanosuspension

Die Herstellung der Nanosuspension (siehe Abbildung 6.1) erfolgte über eine Präzipitationsmethode. Es wurde eine 0,4%ige (m/V) Agarose-Lösung hergestellt, indem das Polymer in alkalischem Aqua bidestillata (pH 10) bei 90°C im Wasserbad gelöst wurde. Außerdem wurde OVA bei Raumtemperatur ebenfalls in alkalischem Aqua bidestillata und einer Konzentration von 0,4% (m/V) gelöst. Beide Lösungen wurden unter Rühren vereinigt und Isopropanol wurde im Verhältnis 2:3 (V/V) langsam hinzugegeben. Isopropanol agiert hierbei als Antisolvens und führt zu einer Desolvatation der Agarosemoleküle. Das Polymer präzipitiert aufgrund der verringerten Löslichkeit in Form von Nanopartikeln und OVA wird gleichzeitig in die Partikel eingeschlossen. Aufgrund der oberflächenaktiven Eigenschaften von OVA, können sich Proteinmoleküle auch auf der Oberfläche der Nanopartikel anreichern und so ein Partikelwachstum verhindern.

Nach Präzipitation der Nanopartikel wurde die Suspension noch so lange gerührt bis die Temperatur unter 30°C gesunken war. Anschließend wurde die Nanosuspension im Kühlschrank bei circa 4°C aufbewahrt, damit die Agarose-Nanopartikel aushärten konnten.

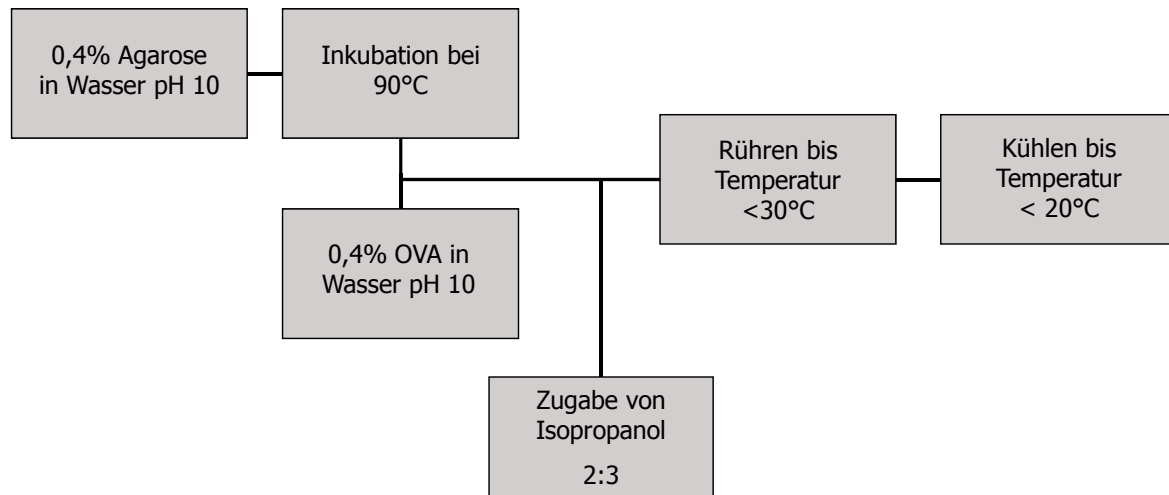


Abbildung 6.1: Herstellungsschema der Nanosuspension

6.3 Charakterisierung der Nanosuspension

Die Morphologie der Nanopartikel ist im TEM-Bild gut zu erkennen (siehe Abbildung 6.2). Neben vielen sphärischen Partikeln liegen auch unregelmäßig geformte und einige agglomerierte, deutlich größere Partikel vor.

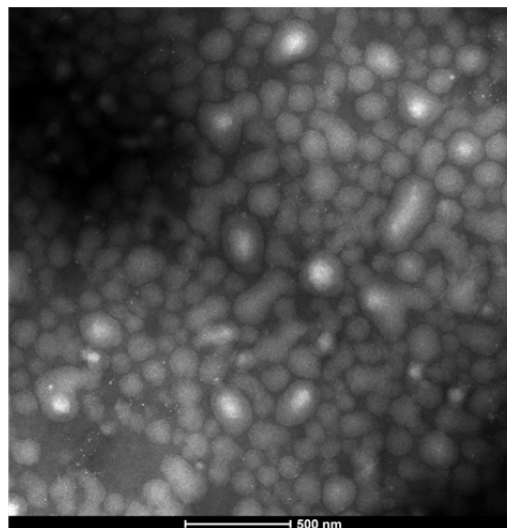


Abbildung 6.2: TEM-Aufnahme der Nanopartikel aus Agarose

Die Partikelgrößenverteilung (Volumendichteverteilung) der Nanosuspension wurde mittels PCS gemessen und ist in Abbildung 6.3 gezeigt. Der als z-average bezeichnete mittlere Partikeldurchmesser beträgt

etwa 210 nm. Der PDI liegt bei 0,171 und zeigt damit eine enge Verteilung an.

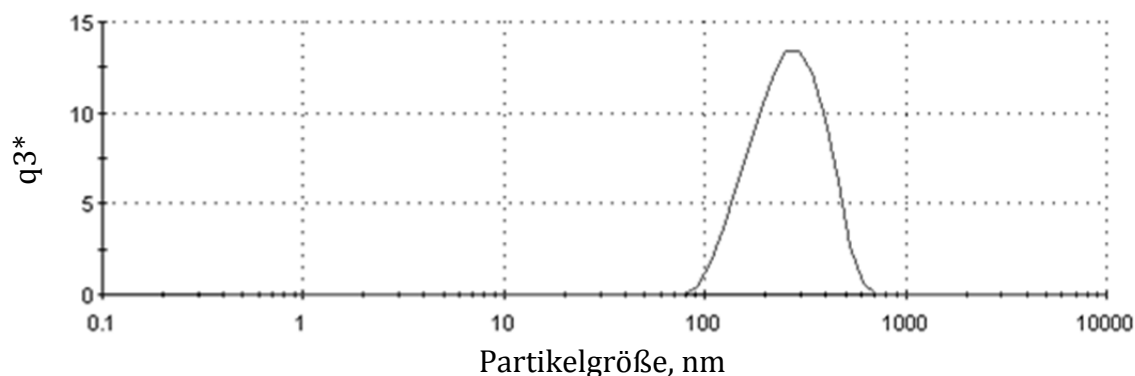


Abbildung 6.3: Partikelgrößenverteilung der Nanosuspension

Die Einschlusseffektivität (loading efficiency, LE) der Nanopartikel beträgt $12,98\% \pm 3,58\%$ (m/V), das heißt von der eingesetzten Gesamtproteinmenge sind etwa 13% mit den Nanopartikeln assoziiert, 87% liegen ungebunden in der Nanosuspension vor. Die Beladekapazität (loading capacity, LC), das heißt der Proteinanteil der Nanopartikel, liegt bei $6,58\% \pm 1,95\%$ (m/m). Die Einschlusseffektivität und die Beladekapazität wurden aus der Differenz der Gesamtmenge an OVA und der Menge an nicht verkapselten, ungebundenem OVA berechnet. Dafür wurde wie in Abschnitt 6.2 beschrieben die Nanosuspension hergestellt. Die Nanopartikel wurden abzentrifugiert und die Konzentration an OVA im Überstand mittels BCA-Assay bestimmt. Die Einschlusseffektivität und die Beladekapazität wurden nach Gleichungen (6.1) und (6.2) berechnet (Amidi et al., 2006).

$$LE = \frac{\text{GesamtmengeOVA} - \text{ungebundenenOVA}}{\text{GesamtmengeOVA}} \times 100\% \quad (6.1)$$

$$LC = \frac{\text{Gesamtmenge OVA} - \text{ungebundenes OVA}}{\text{Masse Nanopartikel}} \times 100\% \quad (6.2)$$

Im Vergleich zu Chitosan-Nanopartikeln, die in der Literatur häufig beschrieben werden (siehe Abschnitt 6.1), weisen die Nanopartikel aus Agarose eine eher geringe Beladekapazität auf. Für diverse Chitosan-Nanopartikel, die zum Beispiel Insulin, BSA oder OVA enthielten, wurden Beladekapazitäten von 30 bis 50% ermittelt (Vila et al., 2002; Calvo, 1997; Amidi et al., 2006). Der hohe Proteingehalt der Chitosan-Nanopartikel lässt sich dadurch erklären, dass Chitosan als Polykation vorliegt und daher mit negativ geladenen Proteinen elektrostatisch wechselwirken kann (Fernandez-Urrusuno et al., 1999). Agarose ist dagegen ein neutrales Polymer, das Proteine nur über Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen assoziieren kann. Aufgrund dieser schwächeren Wechselwirkungen zeigen Agarose-Nanopartikel im Vergleich zu Chitosan-Nanopartikeln eine geringere Beladekapazität. Allerdings ist ein hoher Proteingehalt der Nanopartikel nicht immer notwendig. Die Effektivität einer Vakzinformulierung hängt nicht nur von der Antigenmenge, sondern auch von anderen Faktoren, wie zum Beispiel der adjuvanten Wirkung, ab. Daher lassen sich fundierte Aussagen über die benötigte Antigenmenge nur infolge von zum Beispiel in-vivo Studien machen.

6.4 Herstellung der nanopartikulären Formulierungen

Die Herstellung der finalen nanopartikulären Vakzinformulierungen erfolgte durch Überführung der Nanosuspension in ein trockenes Pulver. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Zum einen

wurden die Nanopartikel via Sprühtrocknung in eine Matrix eingebettet, die die Nanopartikel während des Trocknungsprozesses und der Lagerung stabilisiert. Zum anderen wurden die Nanopartikel mittels eines Coating-Verfahrens auf einen Träger aufgezogen, der eine für die nasale Applikation geeignete Partikelgröße aufweist.

6.4.1 Sprühtrocknung

Die hergestellte Nanosuspension (siehe Abschnitt 6.2) wurde mit einer 18%igen (m/V) Lösung aus Mannitol (Pearlitol 160 C) im Verhältnis 5:2 (V/V) versetzt und anschließend mit Hilfe des Büchi B-290 Laborsprühtrockners getrocknet. Die verwendeten Prozessparameter sind in Tabelle 6.1 dargestellt.

Tabelle 6.1: Prozessparameter der Sprühtrocknung

Parameter	Einstellung
Zuluft-Temperatur	100°C
Abluft-Temperatur	41-43°C
Aspirator	35 m ³ /h
Sprühlufrate	670 l/h
Sprührate Produkt	6-8 ml/min

Nach der Sprühtrocknung wurden Mannitolmikropartikel mit eingebetteten OVA-beladenen Agarosenanopartikeln erhalten, die weiterführend charakterisiert wurden. Abbildung 6.4 (I) zeigt eine schematische Darstellung der Formulierung.

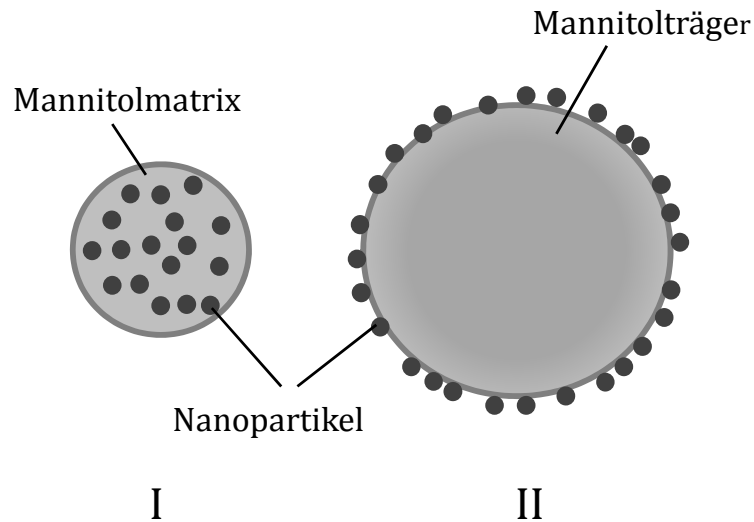


Abbildung 6.4: Schematische Darstellung der nanopartikulären Formulierungen. I: Mannitolmikropartikel mit eingebetteten Nanopartikeln hergestellt durch Sprühtrocknung; II: Mannitolträger beschichtet mit Nanopartikeln

6.4.2 Coating

Alternativ wurden die Nanopartikel mittels eines Coating-Verfahrens auf einen Mannitolträger aufgebracht. Als Trägermaterial wurde Pearlitol 100 SD (Roquette, LeStrem, Frankreich) eingesetzt, welches vor der Verwendung gesiebt wurde. Es wurde die Siebfraction von 45-90 µm ausgewählt, da dieser Partikelgrößenbereich gut für die nasale Anwendung geeignet ist (siehe Kapitel 5.3). Das Coating wurde mit Hilfe einer Innojet Ventilus Laboranlage (Innojet Herbert Hüttlin, Steinen, Deutschland) durchgeführt. Dieses Gerät basiert auf einer Luftgleitschicht-Technologie und kann für die Durchführung von Granulier-, Coating- und Trocknungsprozessen eingesetzt werden. Im Gegensatz zur Wirbelschicht wird die Trocknungsluft dem Produkt nicht durch einen Siebboden zugeführt, sondern durch einen Boden aus konzentrisch angeordneten, überlappenden Metallringen (Treibsatz). Durch die spezielle Luftführung wird das Produkt in eine am Zentrum orientierte, konsequent orbitale Spiralbewegung versetzt. Da das Produkt wie auf einem Luftkissen getragen

bewegt wird, ist dieser Vorgang generell sehr schonend, aber auch sehr effektiv und erlaubt auch das Beschichten von sehr kleinen Trägern. Die Sprühdüse für die Zuführung von Flüssigkeiten befindet sich in der Mitte des Treibsatzes und erzeugt einen radialen, horizontal schräg nach oben austretenden Sprühnebel (Innojet Herbert Hüttlin).

Die Prozessparameter für das Coating der Mannitolpartikel mit Nanosuspension (siehe Abschnitt 6.2) sind in Tabelle 6.1 dargestellt. Die Prozesstemperatur wurde möglichst niedrig gewählt, um die Stabilität des OVAs nicht zu beeinträchtigen. Außerdem wurde die Sprühdüse so eingestellt, dass es nicht zu einer Granulierung des Mannitols kam.

Tabelle 6.2: Prozessparameter während des Coatings

Parameter	Einstellung
Produkttemperatur	35-38°C
Luftmenge	25 m ³ /h
Sprührate Produkt	1,5-2,5 g/min
Sprühdruck	1,2 bar

Nach dem Coating-Prozess wurde eine Formulierung erhalten, bei der sich die Nanopartikel auf der Oberfläche der Mannitolträgerpartikel befinden. Die Formulierung ist in Abbildung 6.4 (II) noch einmal schematisch dargestellt.

6.5 Charakterisierung der sprühgetrockneten Formulierung

6.5.1 Physikochemische Charakterisierung

Die Partikelgrößenverteilung der sprühgetrockneten Mikropartikel wurde mittels Laserdiffraktometrie unter Verwendung des RODOS-Moduls gemessen und ist in Abbildung 6.5 dargestellt. 50% der Partikel sind nach dieser Messung kleiner als $2,3 \mu\text{m} \pm 0,06 \mu\text{m}$. Die Morphologie der Nanopartikel ist anhand der REM-Aufnahmen (siehe Abbildung 6.6) gut zu erkennen: es handelt sich überwiegend um sphärische Partikel, die eine glatte Oberfläche aufweisen. Allerdings weist die Probe auch ein paar unregelmäßig geformte Partikel und Bruchstücke auf.

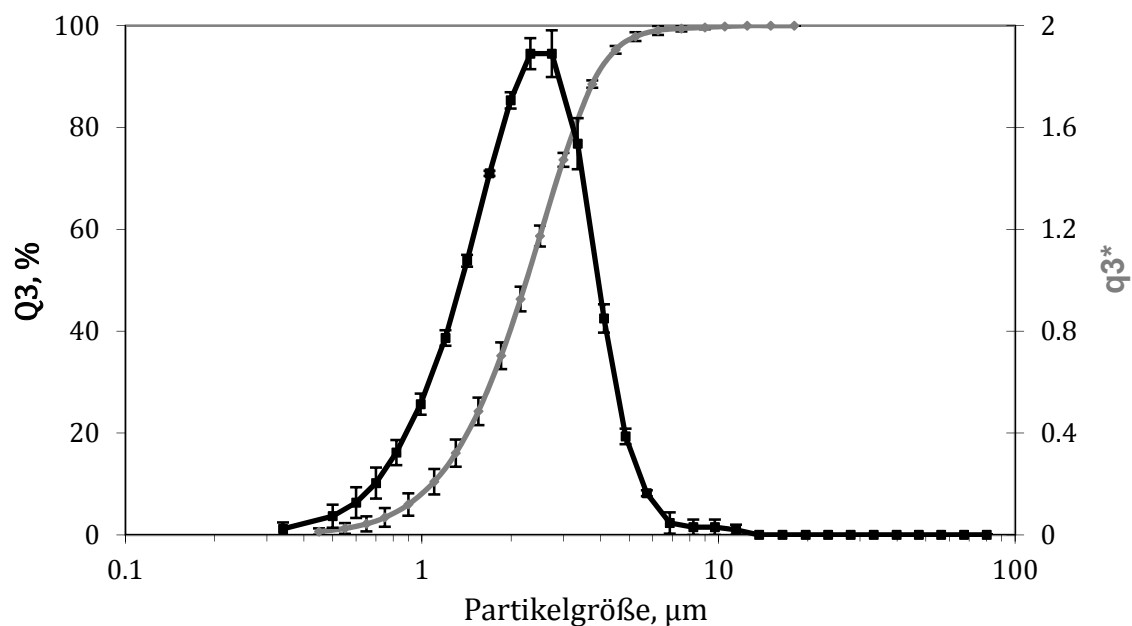


Abbildung 6.5: Partikelgrößenverteilung der sprühgetrockneten Formulierung ($n=3$)

Zur Partikelgrößenbestimmung der Nanopartikel nach der Sprühtrocknung wurde die Formulierung mit Aqua bidestillata versetzt, um die Mannitolmatrix in Lösung zu bringen und die Nanopartikel zu redispergieren.

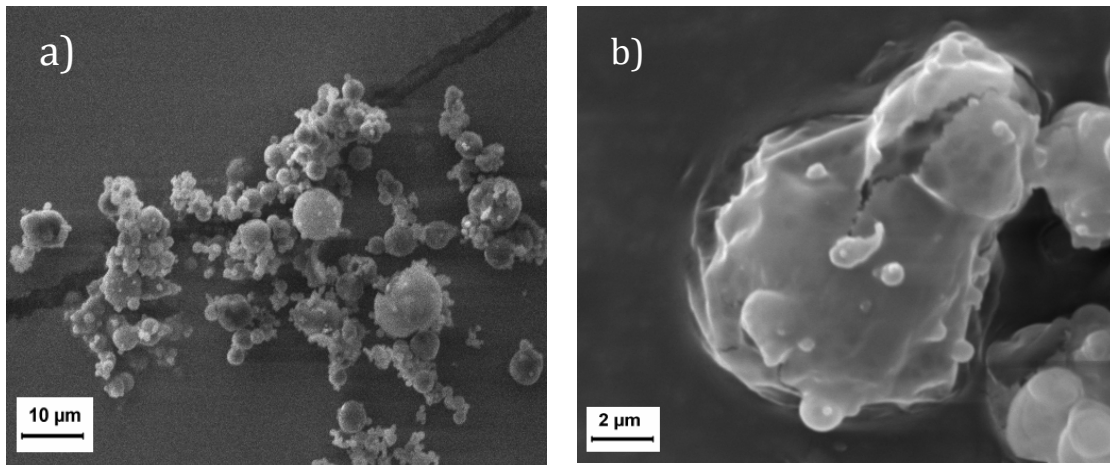


Abbildung 6.6: REM-Aufnahmen der sprühgetrockneten Formulierung
a) 1000fache b) 5000fache Vergrößerung

Der z-average der Nanopartikel beträgt nach dieser Messung 256 nm bei einem PDI von 0,212. Die Partikelgrößenverteilung ist in Abbildung 6.7 dargestellt. Im Vergleich zur Nanosuspension vor der Sprühtrocknung ist die mittlere Partikelgröße der resuspendierten Nanopartikel um 46 nm angestiegen.

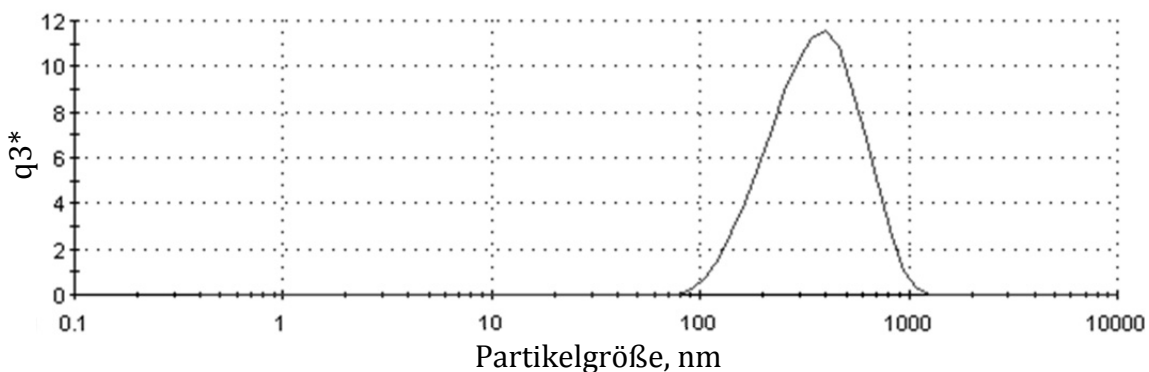


Abbildung 6.7: Partikelgrößenverteilung der Nanopartikel nach
Redispergierung der sprühgetrockneten Formulierung

Die Nanopartikel werden nicht mehr, wie direkt nach der Herstellung, durch Isopropanol dehydratisiert, da sie in Wasser, was den physiologischen Bedingungen eher entspricht und nicht in einem Isopropanol-Wasser-Gemisch resuspendiert wurden. Dies führt dazu, dass die Nanopartikel quellen und stärker hydratisiert vorliegen, so dass der

hydrodynamische Durchmesser zunimmt. Die Partikelgröße der Nanopartikel liegt allerdings auch nach der Resuspendierung im angestrebten Größenbereich, das heißt in der Größenordnung von Pathogenen. Daher sollte eine partikuläre Aufnahme durch M-Zellen oder antigenpräsentierende Zellen im NALT und eine anschließende Prozessierung des Antigens durch Immunzellen möglich sein.

Der Proteingehalt der Formulierung beträgt 0,9% (m/m) und wurde mit Hilfe des BCA-Assays bestimmt. Dazu wurden die Mikropartikel in warmem Aqua bidestillata gelöst und die erhaltene Nanosuspension 24 h stehen gelassen, damit das Protein aus den Nanopartikeln heraus diffundieren kann. Die Nanopartikel wurden mittels Zentrifugation (10 min bei 14000 rpm) entfernt und der Proteingehalt im Überstand bestimmt.

6.5.2 Gleichförmigkeit der abgegebenen Masse

Die Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis wurde, wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, bestimmt und die Ergebnisse sind in Abbildung 6.8 dargestellt. Die Abgabe der Formulierung durch die Applikationshilfe (Powder UDS) ist reproduzierbar und zeigt in Bezug auf die mittlere abgegebene Masse ($98,93\% \pm 0,89\%$) nur geringe Schwankungen. Kein Wert liegt außerhalb der Grenzen von $\pm 20\%$.

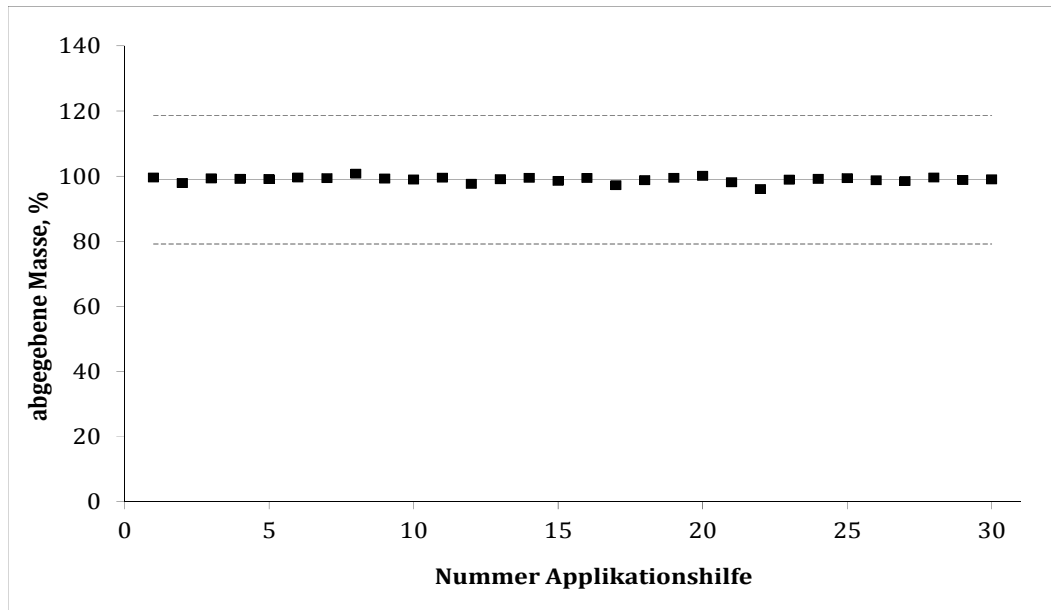


Abbildung 6.8: Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis; die gestrichelten Linien kennzeichnen die Grenzen von $\pm 20\%$ vom Mittelwert; die durchgezogene Linie gibt den Mittelwert an

6.5.3 Nasale Deposition

Für die Bestimmung der nasalen Depositionsprofile der sprühgetrockneten Formulierung wurde als Applikationshilfe das Powder UDS verwendet. Die Bestimmung wurde wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben durchgeführt und die Ergebnisse sind in Abbildung 6.9 dargestellt. Das Depositionsprofil der Bestimmung ohne simuliertem Einatemstrom (0 l/min) zeigt, dass im Vergleich zum idealen Profil ein adäquater Anteil des Proteins in den mittleren und oberen Nasenmuscheln sowie im Nasopharynx abgeschieden wurde. Allerdings ist der abgeschiedene Proteinanteil im Nasenvorhof zu hoch und in den unteren Nasenmuscheln zu gering. Begründet ist dies in der Funktionsweise des Powder UDS. Die Applikationshilfe erzeugt nach dem Auslösen eine sehr schnelle und schmale Aerosolwolke, die direkt auf den Nasenvorhof und die obere Nasenmuschel gerichtet ist. Zudem stellt der Nasenvorhof den engsten Bereich in der Nase dar und ist für größere Partikel schwer zu passieren. Daher wurden über 70% des Proteins in diesen Segmenten des Nasenmodells abgeschieden. Insgesamt wurden 94%

der Formulierung in der Nasenhöhle abgeschieden, was in einer post-nasalen Fraktion von nur 6% resultiert. Aufgrund der geringen mittleren Partikelgröße der Formulierung wäre eine höhere post-nasale Fraktion zu erwarten gewesen, wie es bei den Depositionsuntersuchungen der Mikropartikel zu beobachten war (siehe Abschnitt 5.2.4). In diesem Fall werden in der Formulierung vorliegende Agglomerate nicht durch die Dispergierung mit dem Powder UDS zerstört, so dass eine Deposition hauptsächlich in den vorderen Bereichen der Nase stattfindet.

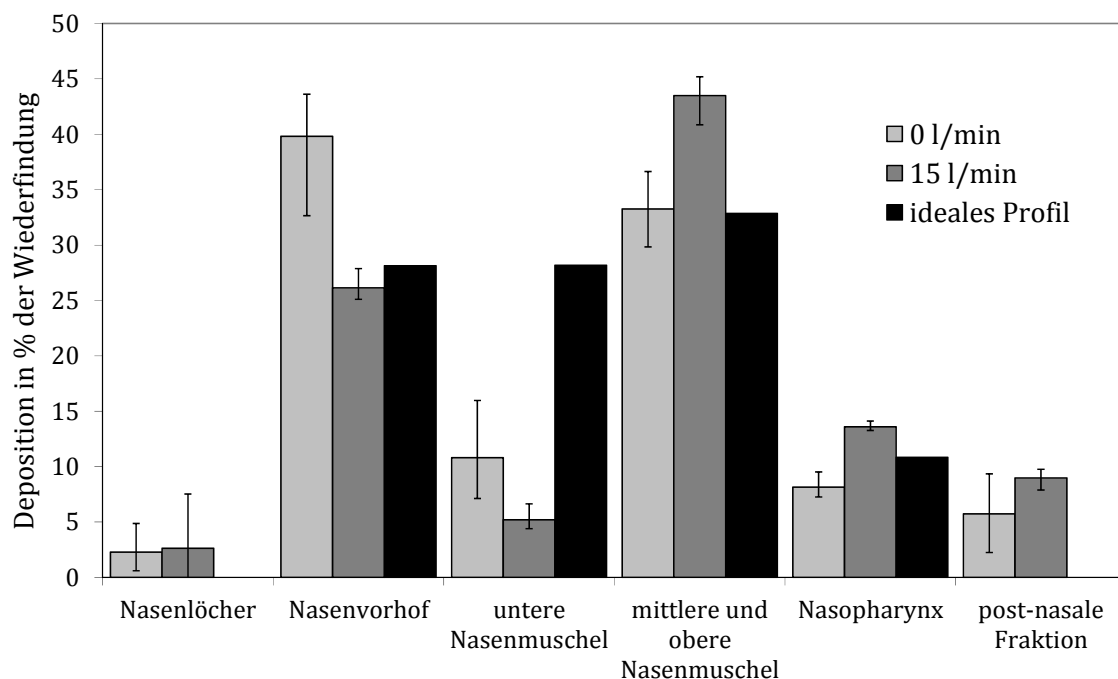


Abbildung 6.9: Depositionsprofile der sprühgetrockneten Formulierung bei 0 l/min und 15 l/min verglichen mit dem idealen Profil, Applikationshilfe Powder UDS, n=3, Fehlerbalken kennzeichnen min-max

Die Bestimmung der nasalen Deposition wurde auch bei simuliertem Einatemstrom (15 l/min) durchgeführt. Im Vergleich zu der Bestimmung bei 0 l/min zeigt die Messung bei 15 l/min eine Verschiebung des Depositionsprofils nach rechts, das heißt zu hinteren Segmenten des Nasenmodells. Der abgeschiedene Proteinanteil im Nasenvorhof ist

reduziert und entspricht annähernd dem Idealprofil. Allerdings ist die Proteindeposition in den unteren Nasenmuscheln deutlich zu gering und in den mittleren und oberen Nasenmuscheln sowie im Nasopharynx vergleichsweise hoch. Die erhöhte Deposition in hinteren Segmenten des Nasenmodells bei simulierter Einatmung lässt sich damit begründen, dass die Mikropartikel aufgrund ihrer geringen Partikelgröße dem Luftstrom folgen können beziehungsweise mitgerissen werden und daher erst in hinteren Bereichen der Nase abgeschieden werden. Die post-nasale Fraktion beträgt bei 15 l/min 9% und ist im Vergleich zur Bestimmung bei 0 l/min nur geringfügig höher. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant.

Die Bestimmung der nasalen Deposition zeigt, dass auf der einen Seite das Powder UDS geeignet ist, um die Formulierung zu dispergieren und in der Nase zu applizieren. Auf der anderen Seite wird deutlich, dass das Depositionsprofil der Formulierung dem Idealprofil eher entspricht, wenn die Bestimmung bei 0 l/min durchgeführt wurde. Daraus lässt sich ableiten, dass eine nasale Applikation bei Patienten unter kurzfristigem Anhalten des Atems empfohlen werden sollte, um eine adäquate Deposition zu gewährleisten.

6.5.4 Freisetzungsuntersuchungen

Die Untersuchungen zur Freisetzung des Proteins aus der Formulierung wurden wie in Abschnitt 4.2.8 beschrieben durchgeführt. Als Freisetzungsmedium wurde zum einen künstliche Nasalflüssigkeit (simulated nasal fluid, SNF; pH 6,4) und zum anderen Phosphatpuffer (pH 5,5, entspricht dem endosomalen pH) eingesetzt. Die resultierenden Freisetzungskurven sind in Abbildung 6.10 dargestellt.

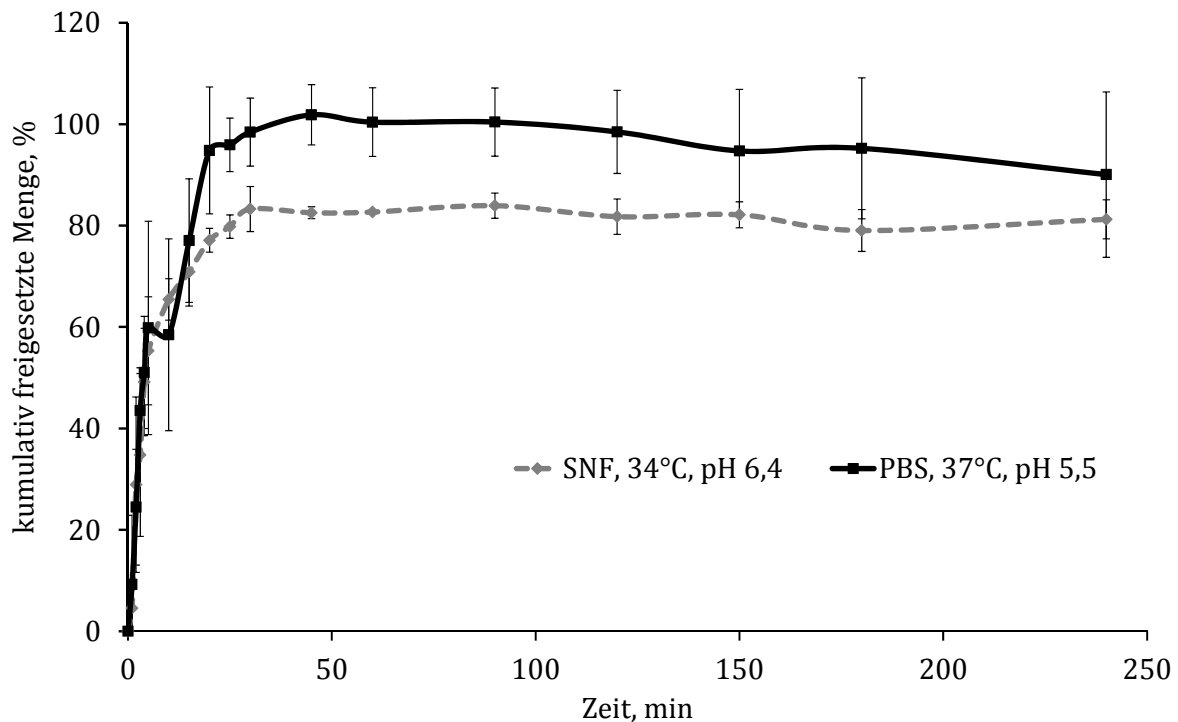


Abbildung 6.10: Freisetzungsprofile der sprühgetrockneten nanopartikulären Formulierung in künstlicher Nasalflüssigkeit (34°C, pH 6,4) und Phosphatpuffer (37°C, pH 5,5), n=3, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an

Die Freisetzungsuntersuchungen in SNF bei 34°C zeigen, dass bereits nach 30 min etwa 80% des OVAs freigesetzt wurde. Ein großer Anteil des Gesamtproteingehalts der Formulierung liegt nicht verkapselt in den Nanopartikeln vor, sondern ist eingebettet in der Mannitolmatrix der Mikropartikel, wie bereits mithilfe der Gehaltsbestimmung gezeigt. Da Mannitol in SNF sehr gut löslich ist, lösen sich die Mikropartikel innerhalb der ersten 30 min der Freisetzung auf und ein großer Anteil des Proteins wird freigesetzt. Nach 30 min erreicht die Freisetzungskurve ein Plateau bei 80% freigesetzter Proteinmenge, das heißt 20% des OVAs verbleiben über mindestens vier Stunden assoziiert mit den Nanopartikeln und werden nicht freigesetzt. Es ist von großem Vorteil, dass noch nicht die gesamte Proteinmenge in der Nasenkavität freigesetzt wird, denn die OVA-beladenen Nanopartikel sollen zunächst vollständig von Immunzellen

aufgenommen werden. Nachdem die Nanopartikel via Endozytose von zum Beispiel Makrophagen oder dendritischen Zellen aufgenommen wurden, soll das Protein innerhalb des in der Zelle befindlichen Endosoms freigesetzt werden, um dann eine Prozessierung des Antigens zu ermöglichen. Um die pH- und Temperaturverhältnisse innerhalb der Zelle zu imitieren, wurden die Freisetzungsuntersuchungen bei 37°C in Phosphatpuffer pH 5,5 durchgeführt (Geisow und Evans, 1984). Diese Freisetzungsuntersuchungen zeigen, dass nach 30 min bereits annähernd 100% des Proteins freigesetzt wurden. Der anfängliche sehr steile Anstieg der Freisetzungskurve ist auf die Freisetzung des in der Mannitolmatrix eingeschlossenen OVAs zurückzuführen. Die Erniedrigung des pH-Wertes und die Erhöhung der Temperatur führten zu einer erwünschten Instabilität der Nanopartikel und einer Zerstörung der Partikelstruktur, so dass auch das verkapselte Protein freigesetzt wurde. Damit ist das System geeignet, partikel-assoziiertes Antigen in die Zelle zu transportieren und dort schnell freizugeben.

6.5.5 Proteinstabilität

Die Stabilität des Proteins nach Herstellung der Formulierung wurde mit Hilfe der SDS-Page und der CD-Spektroskopie überprüft. Abbildung 6.11 zeigt die Ergebnisse der SDS-PAGE der OVA-beladenen Nanopartikel. Das Molekulargewicht und damit die Primärstruktur des Proteins wurde durch die Herstellung der Partikel und die anschließende Sprühtrocknung nicht verändert, wie sich aus der Übereinstimmung der Banden der OVA-Referenz mit denen der Proben ableiten lässt. Außerdem sind keine zusätzlichen Banden, die auf Fragmente oder Aggregation des Proteins hindeuten würden, sichtbar.

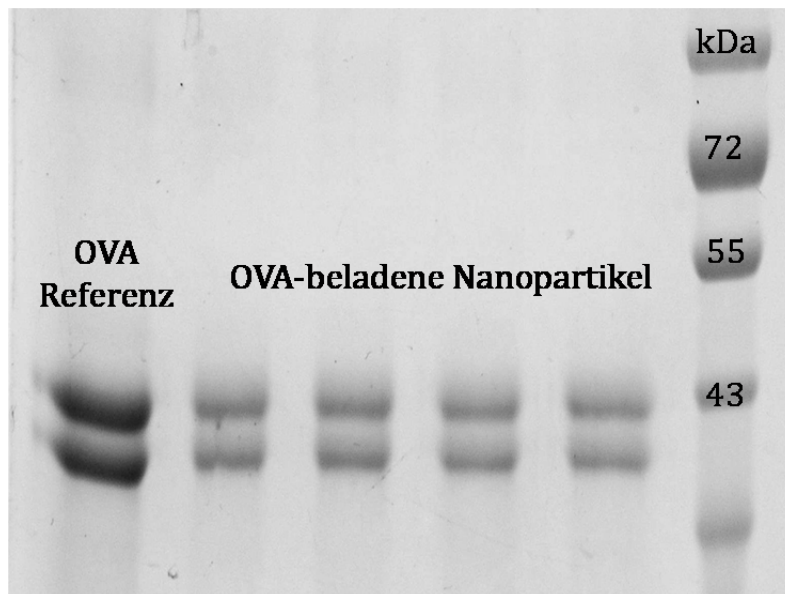


Abbildung 6.11: SDS-PAGE der OVA-beladenen Nanopartikel nach Sprühtrocknung mit Mannitol

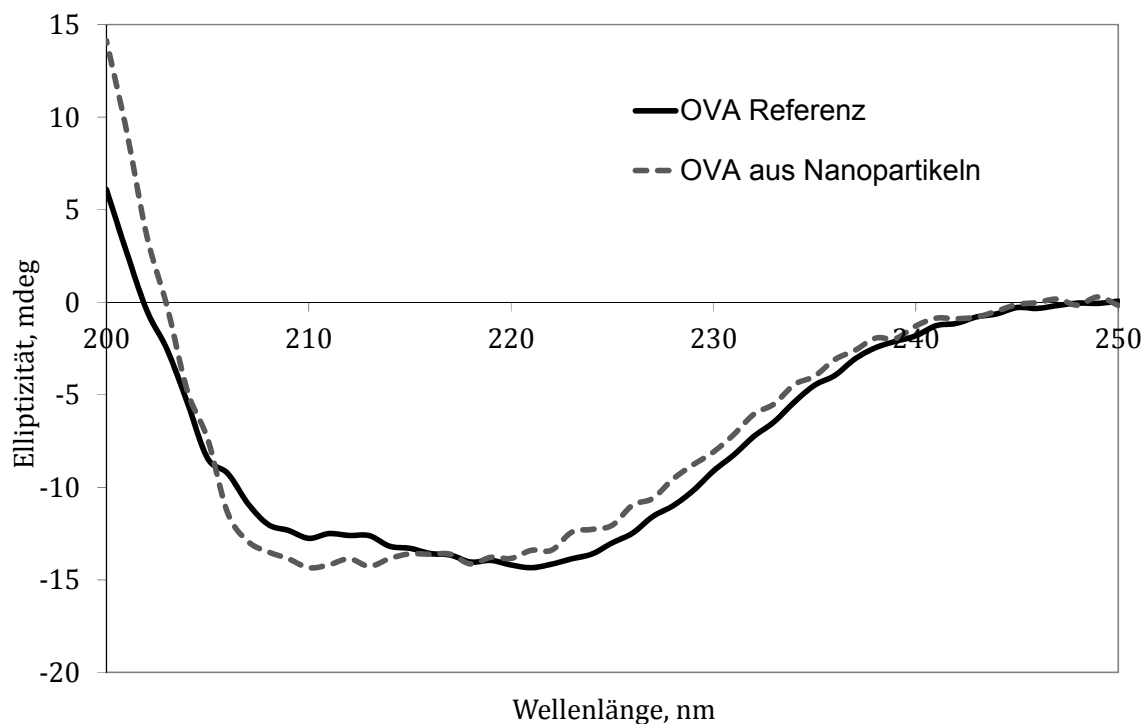


Abbildung 6.12: CD-Spektren von nativem OVA und OVA nach Herstellung der Formulierung

Die Sekundärstruktur des OVAs wurde durch den Herstellungsprozess dagegen leicht verändert. In Abbildung 6.12 sind die CD-Spektren der OVA-Referenz und der Probe dargestellt. Die Spektren der Probe und der

Referenz sind nicht identisch, allerdings unterscheiden sie sich nur in geringem Ausmaß. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Protein nach wie vor eine α -helikale Struktur aufweist. Daraus lässt sich ableiten, dass es durch den Herstellungsprozess nicht zu einer Auffaltung und damit zur Denaturierung des Proteins gekommen ist, sondern dass die Sekundärstruktur des OVAs überwiegend beibehalten wurde.

6.6 Charakterisierung der durch Coating hergestellten Formulierung

6.6.1 Physikochemische Eigenschaften

Die Partikelgrößenverteilung der eingesetzten Mannitolsiebfraktion und des mit Nanosuspension beschichteten Mannitols wurden mit Hilfe der Laserdiffraktometrie unter Verwendung des RODOS-Moduls bestimmt. Die Partikelgrößenverteilungen sind in Abbildung 6.13 dargestellt.

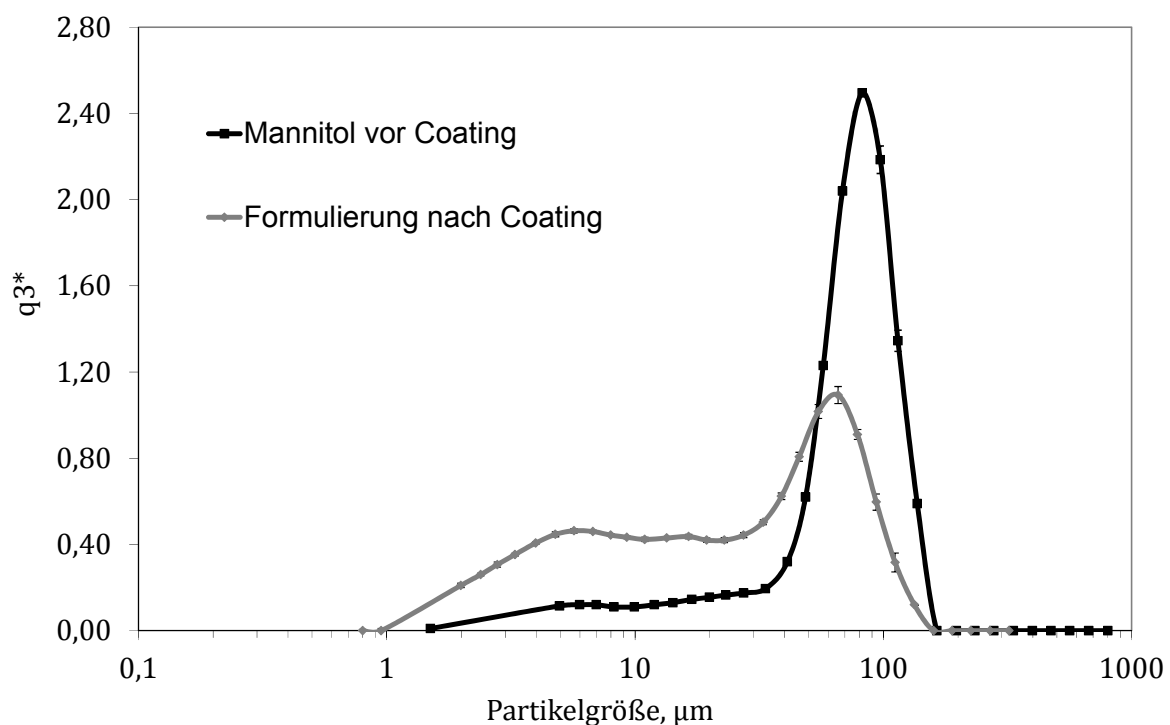


Abbildung 6.13: Partikelgrößenverteilungen des Mannitols vor und nach dem Coating, $n=3$, Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung

Aufgrund der vorangegangenen Siebung zeigt das Ausgangsmaterial eine enge Verteilung und einen sehr geringen Feinanteil. Die mittlere Partikelgröße (x_{50}) beträgt nach dieser Messung $74,4 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$ und liegt damit im mittleren Bereich der verwendeten Siebfraktion von 45-90 μm . In Tabelle 6.3 sind die charakteristischen Partikelgrößen der beiden Verteilungen gegenübergestellt. Die Partikelgrößenverteilung des

Mannitols nach dem Coating mit Nanosuspension weist eine deutlich reduzierte mittlere Partikelgröße ($x_{50}=24,2 \mu\text{m} \pm 1,0 \mu\text{m}$) und erhöhten Feinanteil gegenüber dem unbehandelten Mannitol auf. Die Reduzierung der Partikelgröße lässt sich auf der einen Seite auf die mechanische Belastung, die während des Coating-Prozesses auf das Produkt einwirkt, zurückführen. Die Partikel werden durch einen Luftstrom spiralförmig nach oben transportiert und fallen dann zurück auf ihre Ausgangsposition. Bei dieser Bewegung können die Partikel mit der Innenwand des Gehäuses und der Bodenplatte kollidieren, so dass es durch die Prallwirkung zu einer Verkleinerung der Partikelgröße kommen kann. Auf der anderen Seite ist es möglich, dass während des Sprühvorgangs ein Teil der Nanosuspension getrocknet wird, bevor dieser auf die Mannitolpartikel trifft. Dies führt dann zu trockenen Agglomeraten aus Nanopartikeln und damit zu einem erhöhten Feinanteil in der Partikelgrößenverteilung.

Tabelle 6.3: Quantile der Partikelgrößenverteilungen von Mannitol vor und nach dem Coating mit Nanosuspension, $n=3$, angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung

Partikelgröße Mannitol	$x_{10}, \mu\text{m}$	$x_{50}, \mu\text{m}$	$x_{90}, \mu\text{m}$
vor Coating	$10,6 \pm 0,8$	$74,4 \pm 0,6$	$114,6 \pm 0,3$
nach Coating	$2,7 \pm 0,09$	$24,2 \pm 1,0$	$81,7 \pm 1,5$

Auch anhand der REM-Aufnahmen, welche in Abbildung 6.15 dargestellt sind, lässt sich feststellen, dass in der Formulierung viele Partikel $\leq 20 \mu\text{m}$ vorliegen. Morphologisch betrachtet sind die Partikel unregelmäßig geformt und weisen eine unebene Oberfläche auf. In der 3000fachen Vergrößerung eines Partikels sind auf der Oberfläche die aufgetragenen Nanopartikel zu erkennen.

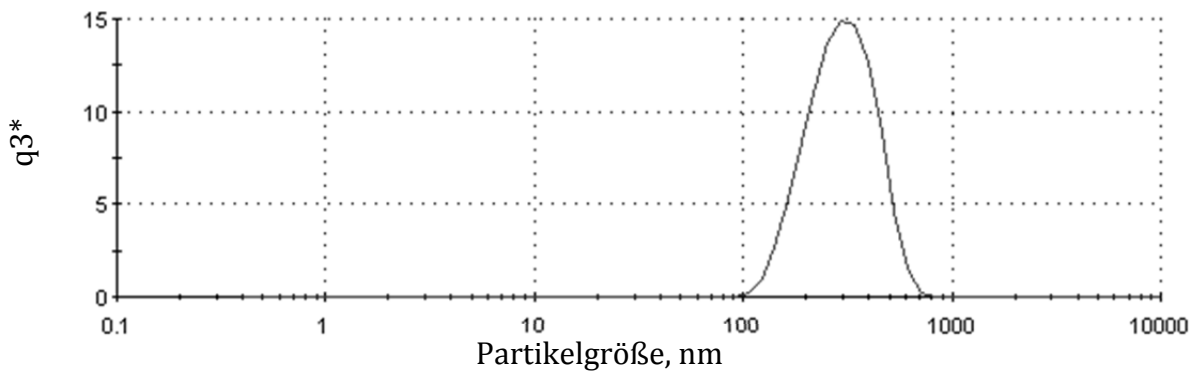


Abbildung 6.14: Partikelgrößenverteilung der Nanopartikel nach Resuspendierung der gecoateten Formulierung

Zur Bestimmung der Partikelgröße der Nanopartikel, wurde die Formulierung mit Aqua bidestillata versetzt, um die Mannitolpartikel zu lösen und die Nanopartikel zu redispergieren. Die Partikelgrößenverteilung, gemessen mittels PCS, ist in Abbildung 6.14 dargestellt. Der z-average beträgt nach dieser Messung 237,5 nm bei einem PDI von 0,173. Diese Werte der charakteristischen Kenngrößen der Partikelgrößenverteilung sind vergleichbar mit denen der Ausgangsnanosuspension. Das heißt, die Größe der Nanopartikel hat sich durch den Coating-Prozess nicht verändert.

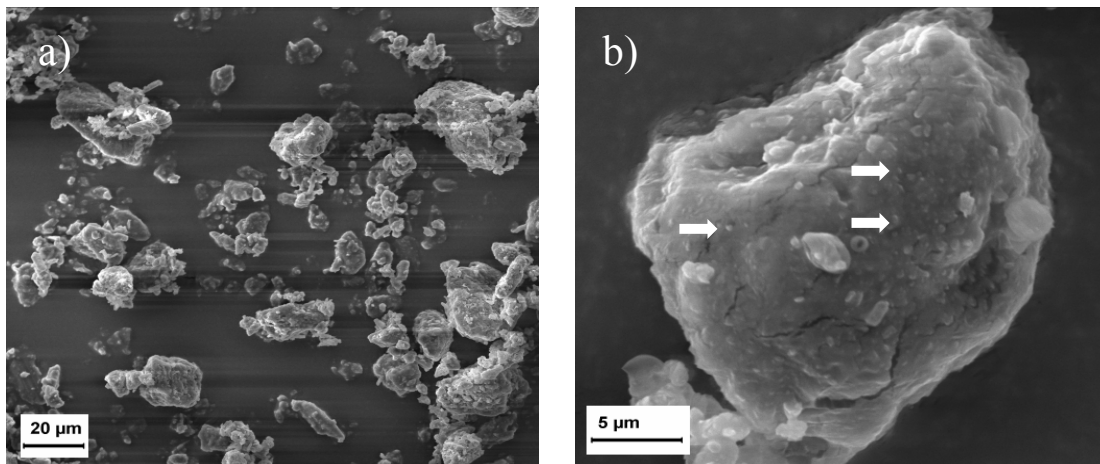


Abbildung 6.15: REM-Aufnahmen der mit Nanosuspension gecoateten Formulierung a) 500fache b) 3000fache Vergrößerung

Der Gehalt der Formulierung wurde mittels BCA-Assay bestimmt und beträgt $0,23\% \pm 0,1\%$ (m/m). Die berechnete Wiederfindung an OVA (wiedergefundene Proteinmenge bezogen auf eingesetzte Proteinmenge) liegt bei 65%, das heißt während des Prozesses kam es zu einem Sprühverlust von 35%. Da die Sprühdüse einen radialen Sprühnebel erzeugt und die Ansatzmenge aus Kostengründen vergleichsweise klein war, wurde vermutlich nicht nur das Mannitol, sondern wurden auch die Innenwände beschichtet. Der hohe Verlust an Nanosuspension ist ein Grund für den geringen Proteingehalt der Formulierung. Ein weiterer Grund ist, dass während des Prozesses nur sehr geringe Sprühraten möglich waren, um ein Auflösen im Dispersionsmedium beziehungsweise Granulieren des Mannitols zu verhindern. Die Prozesszeit zur Herstellung der hier beschriebenen Formulierung betrug etwa 9 Stunden. Der Einsatz eines größeren Volumens an Nanosuspension würde daher zu sehr langen, unwirtschaftlichen Prozesszeiten führen.

6.6.2 Gleichförmigkeit der abgegebenen Masse

Die Gleichförmigkeit der abgegebenen Masse wurde wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind Abbildung 6.16 dargestellt. Die Formulierung lässt sich mit Hilfe des Powder UDS reproduzierbar dispergieren. Die abgegebenen Massen streuen nur wenig um den Mittelwert und keine Masse liegt außerhalb der Grenzen von $\pm 20\%$. Im Mittel werden $99,18\% \pm 0,73\%$ (m/m) der eingewogenen Formulierung dispergiert, was einem geringen Rückstand in der Applikationshilfe von $0,82\%$ entspricht.

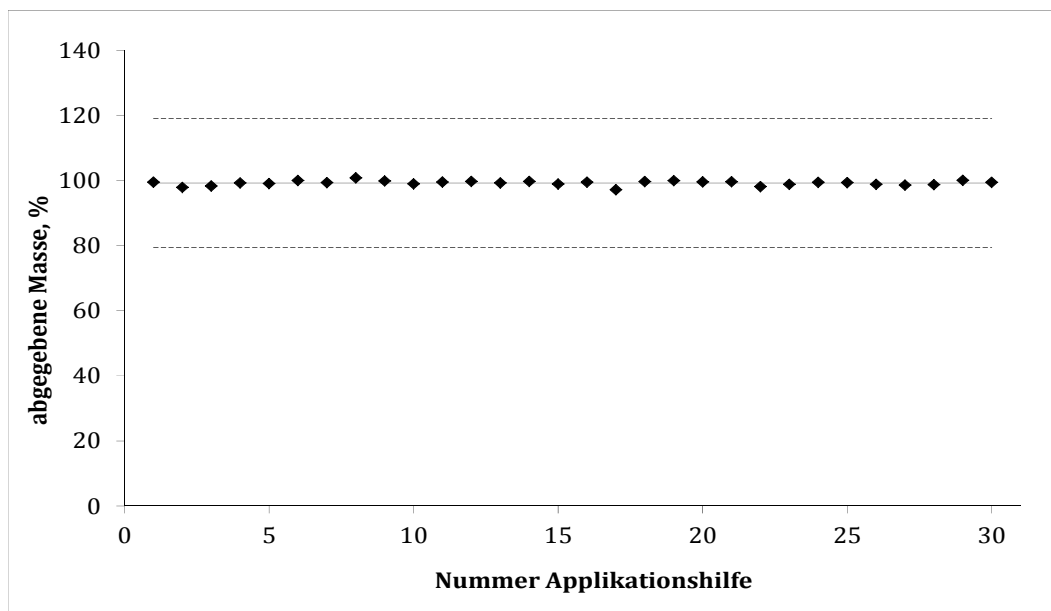


Abbildung 6.16: Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis; die gestrichelten Linien kennzeichnen die Grenzen von $\pm 20\%$ vom Mittelwert; die durchgezogene Linie gibt den Mittelwert an

6.6.3 Nasale Deposition

Die nasale Deposition des mit Nanosuspension gecoateten Mannitols wurden, wie unter Abschnitt 4.2.3 beschrieben, unter Verwendung des Powder UDS bestimmt. Die Depositionsprofile sind in Abbildung 6.17 dargestellt.

Die Depositionsprofile bei 0 l/min zeigen im Vergleich zum idealen Profil eine adäquate Deposition im Nasenvorhof, den oberen und mittleren Nasenmuscheln und im Nasopharynx. Allerdings ist die abgeschiedene Menge an OVA in den unteren Nasenmuscheln unzureichend und die post-nasale Fraktion mit 11% sehr hoch. Das Depositionsprofil bei simuliertem Einatemstrom (15 l/min) zeigt, dass eine zur Bestimmung bei 0 l/min vergleichbare Proteinmenge im Nasenvorhof und den mittleren und oberen Nasenmuscheln abgeschieden wurde. Weiterhin ist anhand der Fehlerbalken zu erkennen, dass die Deposition im Nasenvorhof und Nasopharynx und die post-nasale Fraktion sehr variabel und nicht reproduzierbar sind. Dieses lässt sich auf die breite Partikelgrößenverteilung der Formulierung zurückführen. Wie bereits in Abschnitt 6.5.3 diskutiert, können kleinere Partikel dem Luftstrom folgen und werden erst in späteren Bereichen der Nase beziehungsweise nicht nasal abgeschieden. Größere Partikel hingegen zeigen eine erhöhte Deposition in vorderen Bereichen der Nase, besonders im Nasenvorhof, da dieser Bereich besonders eng ist. Enthält eine abgeteilte Dosis dieser Formulierung nun aufgrund Segregation zufällig viele kleinere Partikel, erfolgt die Deposition in hinteren Bereichen, wie zum Beispiel dem Nasopharynx. Im umgekehrten Fall, das heißt, wenn die Dosis eher größere Partikel enthält, werden diese schon im Nasenvorhof abgeschieden, da sie aufgrund ihrer Trägheit dem Luftstrom nicht folgen können. Daher kommt es in diesen Bereichen zu einer deutlich erhöhten Variabilität in der Deposition.

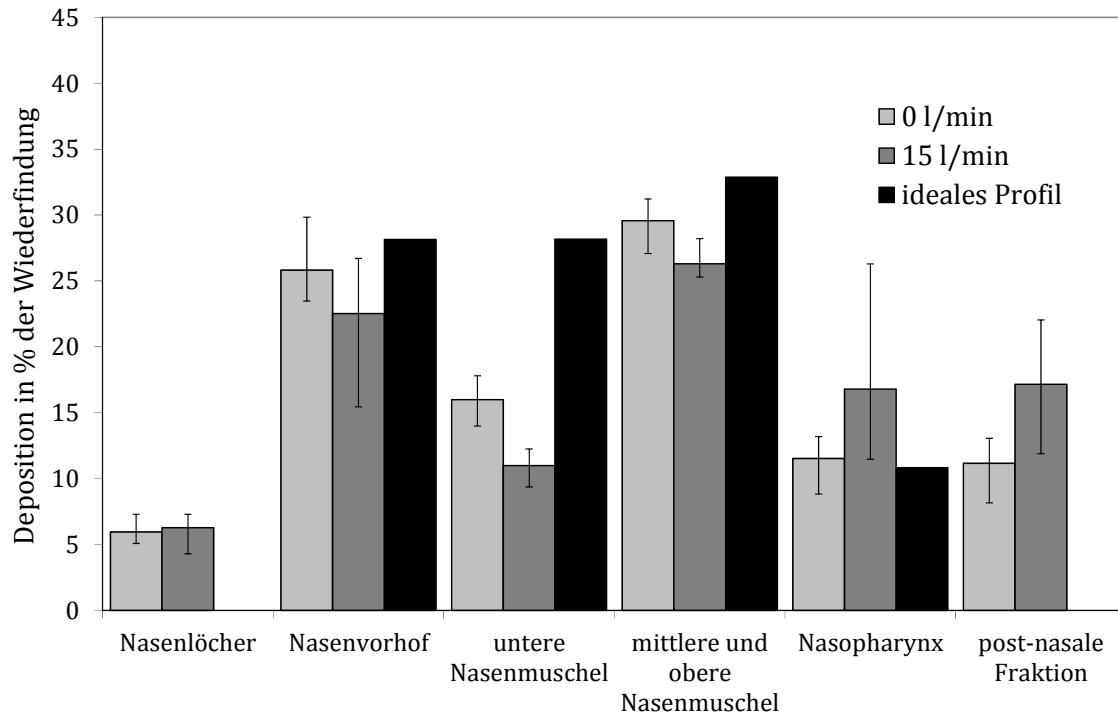


Abbildung 6.17: Depositionsprofile des mit Nanosuspension gecoateten Mannitols bei 0 l/min und 15 l/min, Applikationshilfe Powder UDS, n=3, Fehlerbalken kennzeichnen min-max

Die Depositionsuntersuchungen zeigen, dass eine ausreichende Proteinmenge im Nasenvorhof und den oberen und mittleren Nasenmuscheln, sowohl für die Bestimmungen bei 0 l/min als auch bei 15 l/min, abgeschieden wurde. Dies ist begründet in der Funktionsweise der Applikationshilfe (siehe Abschnitt 6.5.3). Die post-nasale Fraktion ist allerdings bei beiden Depositionsprofilen verhältnismäßig hoch. Bei der Bestimmung ohne simulierten Einatemstrom werden insgesamt 89% der Gesamtproteinmenge in der Nase abgeschieden, bei 15 l/min nur 83%. Da das Depositionsprofil bei 0 l/min im Vergleich zu 15 l/min eher dem Idealprofil entspricht und zu dem eine geringere Variabilität aufweist, ist, wie auch in Abschnitt 6.5.3 diskutiert wurde, eine Applikation unter Anhalten des Atems empfehlenswert.

6.6.4 Proteinstabilität

Der Einfluss des Coating-Prozesses auf die Stabilität des OVAs wurde mit Hilfe der SDS-PAGE und der CD-Spektroskopie ermittelt. In Abbildung 6.18 ist die SDS-PAGE der OVA-haltigen Formulierung und des nativen OVAs (OVA Referenz) dargestellt. Die Banden der Referenz und der Proben stimmen überein und daraus lässt sich ableiten, dass das Molekulargewicht und damit die Primärstruktur des OVAs durch das Herstellungsverfahren nicht verändert wurde. Außerdem sind im Vergleich zur Referenz keine zusätzlichen Banden sichtbar. Es gibt daher keinen Hinweis auf Zersetzung beziehungsweise Denaturierung des Proteins.

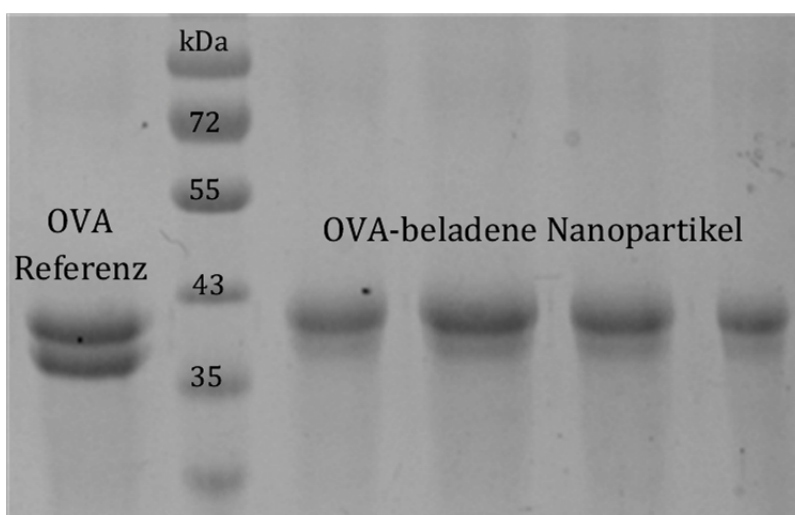


Abbildung 6.18: SDS-PAGE von OVA nach Herstellung der Formulierung

Da die Primärstruktur nach dem Coating-Prozess unverändert ist, wurde die Sekundärstruktur des OVAs mittels CD-Spektroskopie analysiert. Die CD-Spektren der Probe und der OVA Referenz sind in Abbildung 6.19 dargestellt. Die Spektren der OVA Referenz und der Probe sind nicht deckungsgleich, daraus lässt sich schließen, dass der Herstellungsprozess einen Einfluss auf die Konformation der Formulierung hat. Das Spektrum der Probe weist, im Gegensatz zum Spektrum der Referenz, nicht mehr eine eindeutige „W-förmige“ Kurve mit zwei charakteristischen Minima auf. Das

bedeutet, das OVA liegt nicht mehr überwiegend als α -Helix vor. Allerdings gibt es auch keinen Hinweis auf eine komplette Auffaltung und damit Denaturierung des Proteins. Ob die entsprechenden Epitope des OVAs trotz veränderter Sekundärstruktur noch, durch zum Beispiel Antikörper, erkannt werden, lässt sich anhand dieser Ergebnisse nicht eindeutig beurteilen.

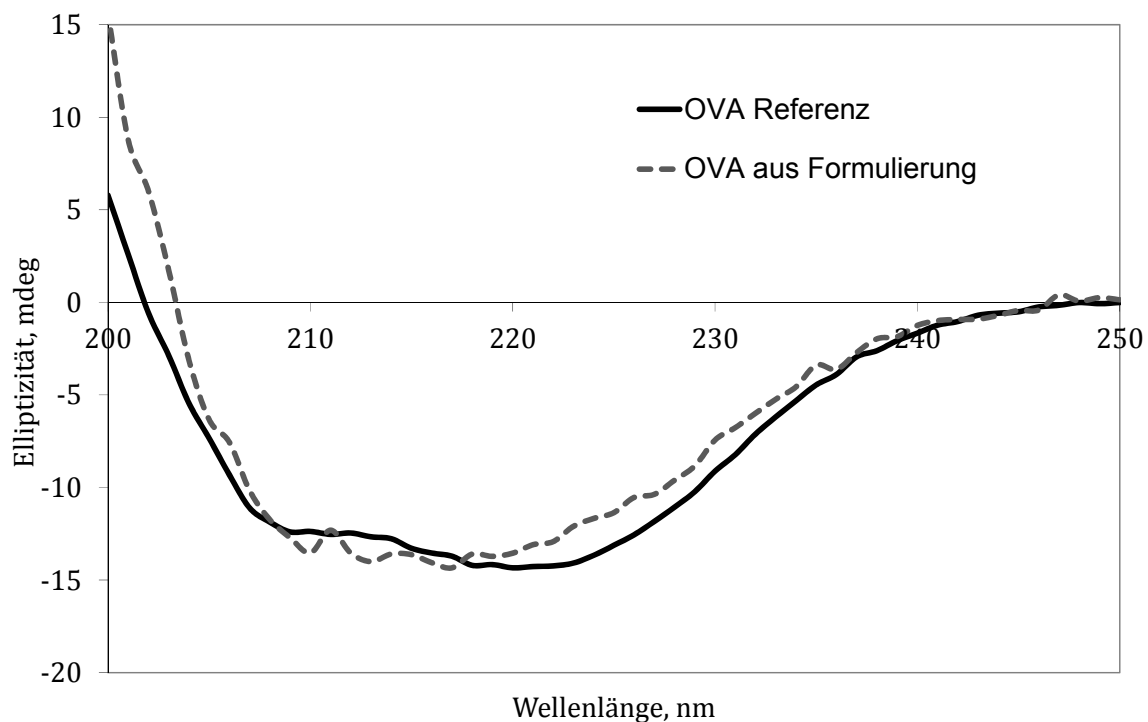


Abbildung 6.19: CD-Spektren von nativem OVA und OVA nach Herstellung der Formulierung

6.7 Zusammenfassung

Die Herstellung der Nanosuspension erfolgte über eine Präzipitationsmethode, die simpel und wenig zeitaufwendig ist. Die Partikelgröße der resultierenden OVA-beladenen Nanopartikel liegt im Größenbereich von Pathogenen, daher sollte eine Aufnahme durch Immunzellen im NALT möglich sein. Die finale Vakzinformulierung wurde zum einen durch Sprühtrocknung und zum anderen durch einen Coating-Prozess hergestellt. Die Partikelgröße der Nanopartikel unterlag dabei nur

sehr geringen Veränderungen. Das Freisetzungsverhalten der sprühgetrockneten Formulierung entspricht überwiegend den Erwartungen. Sowohl in SNF pH 6,4 als auch in Phosphatpuffer pH 5,5 kommt es zu einer schnellen Freisetzung des Proteins, allerdings erfolgt eine vollständige Freisetzung nur in Phosphatpuffer. In SNF bleiben 20% des Proteins mit den Nanopartikeln assoziiert und werden über einen Zeitraum von 4 h nicht freigesetzt, allerdings sollte dieser Proteinanteil noch durch eine Optimierung der Beladekapazität der Nanopartikel erhöht und der Anteil an Protein in der Mannitolmatrix reduziert werden, damit eine größere Menge Protein erst nach Aufnahme der Partikel durch Immunzellen und nicht schon auf der Nasalmukosa freigesetzt wird. Ferner lassen sich beide nanopartikulären Formulierungen mit dem Powder UDS dispergieren und zeigen Gleichförmigkeit in der abgegebenen Masse. Allerdings unterscheiden sich die Formulierungen deutlich in ihren Depositionsprofilen. Während die sprühgetrocknete Formulierung bei 0 l/min eine adäquate Deposition mit einer vergleichsweise geringen post-nasalen Fraktion aufweist, zeigt die Formulierung, die durch den Coating-Prozess hergestellt wurde, unter vergleichbaren Bedingungen eine doppelt so hohe post-nasale Fraktion. Neben den ungünstigeren Depositionsprofilen, wird bei dieser Formulierung zudem deutlich, dass der Herstellungsprozess die Stabilität des Proteins in größerem Ausmaß beeinflusst als es bei der durch Sprühtrocknung hergestellten Formulierung der Fall ist. Außerdem sind bei der Sprühtrocknung deutlich kürzere Prozesszeiten möglich, als es bei dem Coating-Prozess der Fall ist.

Aufgrund der genannten Kriterien scheint die sprühgetrocknete nanopartikuläre Formulierung daher der durch das Coating-Verfahren hergestellten Formulierung überlegen zu sein.

7 Zusammenfassung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung und Charakterisierung von Pulverformulierungen für die nasale Vakzinierung beschrieben. Dabei werden mit den mikropartikulären und nanopartikulären Formulierungen zwei unterschiedliche Formulierungsansätze verfolgt.

Die mikropartikulären Formulierungen beinhalten sprühgetrocknete Chitosan-Mikropartikel, in denen ein Modellantigen, das Rinderserumalbumin (BSA), inkorporiert ist. Die Partikelgröße der Mikropartikel liegt im unteren Mikrometerbereich, was im Hinblick auf eine partikuläre Aufnahme durch spezialisierte Zellen des lymphatischen Gewebes der Nase und eine anschließende lokale Prozessierung vorteilhaft ist. Allerdings lassen sich die Mikropartikel durch die verwendete Applikationshilfe, den PowderJet, nicht reproduzierbar dispergieren und weisen ein ungünstiges nasales Depositionsprofil mit einer hohen post-nasalen Fraktion auf. Um diese Eigenschaften zu verbessern, wurden die Mikropartikel zusammen mit unterschiedlichen Trägermaterialien (Mannitol, Sorbitol, Maltitol) gemischt und so interaktive Pulvermischungen hergestellt. Die Mikropartikel adhärieren auf der Oberfläche der größeren Trägerpartikel, welche aufgrund ihrer Größe und der damit verbundenen Trägheit überwiegend nasal abgeschieden werden. Aufgrund der Codeposition von Mikro- und Trägerpartikeln kann die nasale Deposition verbessert und die post-nasale Fraktion deutlich reduziert werden. Die Untersuchungen zeigten außerdem, dass die nasale Deposition nicht nur von der Formulierung, sondern auch von der Applikationshilfe abhängig ist. So konnten mit Hilfe des Powder UDS, welches für die

Einmalapplikation von Pulvern entwickelt wurde, bessere Ergebnisse als mit dem reservoirbasierten PowderJet erzielt werden.

Für die nanopartikulären Formulierungen wurden Nanopartikel aus Agarose mittels einer Präzipitationsmethode hergestellt, die mit einem Modellantigen, dem Ovalbumin (OVA), beladen sind. Um diese Nanosuspension in eine finale Pulverformulierung zu überführen, wurden zwei unterschiedliche Methoden genutzt. Zum einen wurde die Nanosuspension zusammen mit Mannitol sprühgetrocknet, so dass die Nanopartikel in eine mikropartikuläre Matrix eingebettet wurden. Zum anderen wurden Trägerpartikel aus Mannitol mit der Nanosuspension gecoatet. In diesem Fall lagen die Nanopartikel auf der Oberfläche des Mannitols vor. Beide Formulierungen lassen sich mit Hilfe des Powder UDS dispergieren, allerdings unterscheiden sie sich in ihren Depositionsprofilen. Während die gecoatete Formulierung zu einer unerwartet hohen post-nasalen Fraktion führt, zeigt die sprühgetrocknete Formulierung eine angemessene nasale Deposition und ist daher für die nasale Anwendung besser geeignet.

Neben der Entwicklung und der anwendungsorientierten Charakterisierung der Formulierungen wurde auch die Stabilität der verwendeten Modellantigene untersucht. Die Herstellung der primären Antigenträger (Mikropartikel und Nanopartikel) beeinflusst die Primärstruktur der Proteine nicht und die Sekundärstruktur nur geringfügig. Die Untersuchung der Lagerstabilität der Chitosan-Mikropartikel zeigte, dass eine Lagerung bei erhöhter Temperatur und Luftfeuchte (40°C/75% rF) zwar zu einer nennenswerten Reduzierung des Proteingehalts führte, allerdings bleiben sowohl die Primär- als auch die Sekundärstruktur des BSAs bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von sechs Monaten annähernd unverändert. Allerdings ist die Proteinstabilität insgesamt noch nicht zufriedenstellend und im Hinblick auf eine

dahingehende Optimierung der Formulierung sollte auch der Einsatz alternativer Polymere evaluiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl der mikro- als auch der nanopartikuläre Ansatz zu vielversprechenden Pulverformulierungen für die nasale Vakzinierung geführt haben. Die Mikropartikel bieten den Vorteil, dass eine Aufnahme größerer Mengen eines Antigens über spezialisierte M-Zellen erfolgen kann. Die Nanopartikel werden dagegen schneller, vor allem von im Gewebe verteilten dendritischen Zellen, aufgenommen. Daher wäre im Hinblick auf eine optimale Formulierung auch eine Kombination dieser beiden Antigenträger denkbar.

8 Abstract

The aim of the study was the development and characterization of dry powder formulations for nasal vaccination. For this, two formulation strategies were evaluated, which involve nano- as well as microparticulate formulations.

The microparticulate formulations contain spray dried chitosan microparticles with incorporated bovine serum albumin (BSA) as a model antigen. The particle size of the microparticles is in the low micrometer range which allows uptake of the particles by specialized cells of the nasal lymphoid tissue and hence local processing. However, the microparticles cannot be dispersed reproducibly by the utilized nasal device (PowderJet) and nasal deposition profiles show an undesired high post-nasal fraction. In order to improve the performance interactive powder blends showing low separation tendency were implemented using sugar alcohols (mannitol, sorbitol, maltitol) as carriers. Based on the co-deposition of microparticles and carrier the nasal deposition is improved and the post-nasal fraction is significantly reduced. In addition, experiments showed that the nasal deposition is not only dependent on the formulation but also on the device. Comparing two devices, the Powder UDS, which is a disposable single use device, leads to better deposition profiles and is therefore superior to the reservoir-based PowderJet.

For the nanoparticulate formulations agarose nanoparticles containing the model antigen ovalbumin (OVA) were prepared by a precipitation method. In order to convert the obtained nanosuspension into a dry powder two different methods were used. On the one hand, the nanosuspension was spray dried together with mannitol. In this case the nanoparticles were

embedded in a microparticulate mannitol matrix. On the other hand, mannitol carrier particles were coated with the nanosuspension so that in the final formulation the nanoparticles were located on the surface of the carrier. Both formulations can be readily dispersed by means of the Powder UDS, but show differences in the nasal deposition profiles. While the coated formulation leads to a high post-nasal fraction the spray dried formulation reveals an appropriate nasal deposition profile and is therefore more suitable for nasal administration.

In addition to the development and application-oriented characterization of the formulations the stability of the model antigens was analyzed. The preparation methods of the antigen delivery systems (micro- and nanoparticles) do not influence the primary structure of the proteins and the secondary structure was only marginally changed. The examination of the storage stability of the chitosan microparticles revealed that storage at elevated temperature and relative humidity (40°C/75% RH) leads to a noteworthy decrease in protein content, but during six months storage at room temperature the protein showed no change in primary and secondary structure. Overall the protein stability needs to be improved and for this the use of alternative polymers should be evaluated.

In conclusion, the developed micro- and nanoparticulate formulations are promising delivery systems for nasal vaccination. Microparticles can be taken up by specialized M-cells in the nasal associated lymphoid tissue and are able to deliver higher amounts of antigens, whereas nanoparticles can be taken up faster especially by dendritic cells distributed throughout the epithelium. Therefore a combination of both delivery systems might also be feasible.

9 Anhang

9.1 Verwendete Abkürzungen und Symbole

µl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
µm	Mikrometer (10^{-6} Meter)
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation oder Zirkulardichroismus
CLIP	class-II invariant chain peptide
d	Durchmesser
Da	Dalton
DC	dendritische Zelle
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
h	Stunde
IFN-γ	Interferon-γ
IgA	Immunglobulin A
IL	Interleukin
ISCOM	immunostimulating complexes
l	Liter
m/m	Masse pro Masse
m/V	Masse pro Volumen
m ³	Kubikmeter

mdeg	millidegrees
mg	Milligramm (10^{-3} Gramm)
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
NALT	nasal-associated lymphoid tissue
nm	Nanometer (10^{-9} Meter)
OVA	Ovalbumin
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rpm	rounds per minute
s	Sekunde oder Standardabweichung
t	Zeit
TAP	transporter associated with antigen processing
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
USP	United States Pharmacopeia

10 Literaturverzeichnis

- Aitken, A. und Learmonth, M. P. (1996). Protein Determination by UV Absorption. In: Walker, J. M. (Hg.): *The Protein Protocols Handbook*. 2. Aufl. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 3–6.
- Alliance Protein Laboratories Inc. Circular Dichroism. www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm.
- Alpar, H. O.; Somavarapu, S.; Atuah, K. N.; Bramwell, V. W. (2005). Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 411–430.
- Amidi, M.; Romeijn, S. G.; Borchard, G.; Junginger, H. E.; Hennink, W. E.; Jiskoot, W. (2006). Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *Journal of Controlled Release*, 111, 107–116.
- Ammon, H. P. T. (2004). Hunnius. Pharmazeutisches Wörterbuch. 9. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin.
- Arakawa, T.; Prestrelski, S. J.; Kenney, W. C.; Carpenter, J. F. (2001). Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 307–326.
- Armisen, R. und Galatas, F. (2000). Agar. In: Phillips, G. O. und Williams, P.A. (Hg.) *Handbook of Hydrocolloids*, 21–40.
- Autenrieth, I. B. und Noll, A. (1998). Perspektiven für die Entwicklung neuer Impfstoffe. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 146, 355–364.
- Bansil, R. und Turner, B. S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11, 164–170.
- Batra, P. P.; Sasa, K.; Ueki, T.; Takeda, K. (1989). Circular dichroic study of conformational changes in ovalbumin. *Journal of Protein Chemistry*, 8, 221–229.
- Bernkop-Schnürch, A. (2005). Thiomers: A new generation of mucoadhesive polymers. Mucoadhesive Polymers: Strategies, Achievements and Future Challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1569–1582.
- Bhavsar, M. D. und Amiji, M. M. (2007). Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 4, 197–213.

- Blos, R. (1925). Der lymphatische Rachenring und die Konstitution. *Zeitschrift für Kinderheilkunde*, 39, 147-165.
- Boenninghaus, H.-G. (1977). Hals-Nasen-Ohrenheilkunde für Medizinstudenten, Springer-Verlag, Berlin.
- Boyaka, P. N.; McGhee, J. R.; Czerkinsky, C.; Mestecky, J. (2005). Mucosal Vaccines: An Overview. In: Jiri Mestecky et al. (Hg.): *Mucosal Immunology* 3. Aufl., Burlington: Academic Press, 855-874.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brahma, A.; Mandal, C.; Bhattacharyya, D. (2005). Characterization of a dimeric unfolding intermediate of bovine serum albumin under mildly acidic condition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1751, 159-169.
- Brandau, D. T.; Jones, L. S.; Wiethoff, C. M.; Rexroad, J.; Middaugh, C. R. (2003). Thermal stability of vaccines. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92, 218-231.
- Büchi (2007). The Laboratory Assistant.
- Callens, C.; Ceulemans, J.; Ludwig, A.; Foreman, P.; Remon, J. P. (2003). Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55, 323-328.
- Calvo, P.; Remunan-Lopez, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. (1997). Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63, 125-132.
- Carter, D. C. und He, X. M. (1990). Structure of human serum albumin, *Science*, 249, 302-303.
- Carter, D. C. und Ho, J. X. (1994). Serum Albumin. *Advanced Protein Chemistry*, 45, 153-203.
- Chadwick, S.; Kriegel, C.; Amiji, M. (2010). Nanotechnology solutions for mucosal immunization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 394-407.
- Cheng, Y.-S.; Yeh, H.; Swift, D. (1991). Aerosol Deposition in Human Nasal Airway for Particles 1nm to 20 µm: A Model Study. *Radiation Protection Dosimetry*, 38, 41-47.
- Chow, A. H.; Tong, H. H.; Chattopadhyay, P.; Shekunov, B. Y. (2007). Particle engineering for pulmonary drug delivery. *Pharmaceutical research*, 24, 411-437.

- Clark, M. A.; Jepson, M. A.; Hirst, B. H. (2001). Exploiting M cells for drug and vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50, 81–106.
- Csaba, N.; Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M. J. (2006). The performance of nanocarriers for transmucosal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 3, 463–478.
- Csaba, N.; Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M. J. (2009). Nanoparticles for nasal vaccination. *Advanced drug delivery reviews*, 61, 140–157.
- Curigliano, G.; Rescigno, M.; Goldhirsch, A. (2007). Immunology and breast cancer: Therapeutic cancer vaccines. *The Breast*, 16, 20–26.
- Davis, S. S. (2001). Nasal vaccines. *Advanced drug delivery reviews*, 51, 21–42.
- Dodane, V.; Amin Khan, M.; Merwin, J. R. (1999). Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *International Journal of Pharmaceutics*, 182, 21–32.
- Egermann, H. (1991). Mischungen. In: Nürnberg, E. und Surman, P. (Hg.) *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, Band 2, Springer-Verlag, Berlin.
- Elad, D.; Wolf, M.; Keck, T. (2008). Air-conditioning in the human nasal cavity. Respiratory Biomechanics. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 163, 121–127.
- Elversson, J.; Millqvist-Fureby, A.; Alderborn, G.; Elofsson, U. (2003). Droplet and particle size relationship and shell thickness of inhalable lactose particles during spray drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92, 900–910.
- Emea (2010). Guidline on the investigation of bioequivalence, London.
- Fachinformations Service (2012a). Fachinformation FLUAD, www.fachinfo.de, 06.11.2012
- Fachinformations Service (2012b). Fachinformation Fluenz® Nasenspray, www.fachinfo.de, 06.11.2012
- Fachinformations Service (2012c). Fachinformation Inflexal V®. www.fachinfo.de, 10.11.2012
- Faller, A. (1995). Der Körper des Menschen. Einführung in Bau und Funktion. 12. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- Feng, L.; Qi, X. R.; Zhou, X. J.; Maitani, Y.; Cong Wang, S.; Jiang, Y.; Nagai, T. (2006). Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*, 112, 35–42.

- Fernandez-Urrusuno, R.; Calvo, P.; Remunan-Lopez, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. (1999). Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 16, 1576–1581.
- Folin, O. und Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 627–650.
- Fothergill, L. A. und Fothergill, J. E. (1970). Thiol and Disulphide Contents of Hen Ovalbumin. *Biochemistry Journal*, 116, 555–561.
- Frick, H.; Leonhardt, H.; Starck, D. (1992). Allgemeine Anatomie. Spezielle Anatomie. 1. Extremitäten - Rumpfwand - Kopf - Hals. 4. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- Fry, F. A. und Black, A. (1973). Regional deposition and clearance of particles in the human nose. *Journal of Aerosol Science*, 4, 113–124.
- Garmise, R. J.; Mar, K.; Crowder, T. M.; Hwang, C. R.; Ferriter, M.; Huang, J.; Mikszta, J. A.; Sullivan, V. J.; Hickey, A. J. (2006). Formulation of a dry powder Influenza vaccine for nasal delivery. *AAPS PharmSciTech*, 7, E1-E7.
- Garmise, R. J. und Hickey, A. (2009). Dry powder nasal vaccines as an alternative to needle-based delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 26, 1–27.
- Geisow, M. J. und Evans, W. H. (1984). pH in the endosome: Measurements during pinocytosis and receptor-mediated endocytosis. *Experimental Cell Research*, 150, 36–46.
- Gettins, P. G. W. (2002). Serpin Structure, Mechanism, and Function. *Chemical Reviews*, 102, 4751-4803.
- Geurkink, N. (1983). Nasal anatomy, physiology, and function. 40th Annual Meeting. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 72, 123–128.
- Gratton, S.; Ropp, P. A.; Pohlhaus, P. D.; Luft, J. C.; Madden, V. J.; Napier, M. E.; DeSimone, J. M. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 11613–11618.
- Gross, S.; Geldmacher, A.; Sharav, T.; Losch, F.; Walden, P. (2009). Immunosuppressive mechanisms in cancer: Consequences for the development of therapeutic vaccines. *Vaccine*, 27, 3398–3400.
- Guilmette, R. A. und Gagliano, T. J. (1994). Construction of a Model of Human Nasal Airways Using In Vivo Morphometric Data. *Annals of Occupational Hygiene*, 38, 69–75.

- Gupta, R. K. (1998). Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Vaccine Adjuvants. Advanced Drug Delivery Reviews*, 32, 155–172.
- Gupta, R. K. und Siber, G. R. (1995). Adjuvants for human vaccines - current status, problems and future prospects. *Vaccine*, 13, 1263–1276.
- Hardy, J. G.; Lee, S. W.; Wilson, C. G. (1985). Intranasal drug delivery by spray and drops. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 37, 294–297.
- Häußermann, S.; Bailey, A. G.; Bailey, M. R.; Etherington, G.; Youngman, M. (2002). The influence of breathing patterns on particle deposition in a nasal replicate cast. *Journal of Aerosol Science*, 33, 923–933.
- Hegg, P.-O.; Martens, H.; Löfqvist, B. (1979). Effects of pH and neutral salts on the formation and quality of thermal aggregates of ovalbumin. A study on thermal aggregation and denaturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30, 981–993.
- Helmstädter, A. (2008). Zur Geschichte der aktiven Immunisierung. Vorbeugen ist besser als Heilen. *Pharmazie in unserer Zeit*, 37, 12–18.
- Hu, H. Y. und Du, H. N. (2000). α -to- β Structural Transformation of Ovalbumin: Heat and pH Effects. *Journal of Protein Chemistry*, 19, 177–183.
- Huang, J.; Garmise, R. J.; Crowder, T. M.; Mar, K.; Hwang, C. R.; Hickey, A. J.; Mikszta, J. A.; Sullivan, V. J. (2004). A novel dry powder influenza vaccine and intranasal delivery technology: induction of systemic and mucosal immune responses in rats. *Vaccine*, 23, 794–801.
- Huang, B.; Kim, H. Y.; Dass, C. (2004). Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15, 1237–1247.
- Hughes, R.; Watterson, J.; Dickens, C.; Ward, D.; Banaszek, A. (2008). Development of a nasal cast model to test medicinal nasal devices. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers*, 222, 1013–1022.
- Huntington, J. A. und Stein, P. E. (2001). Structure and properties of ovalbumin. Elucidation of Allergens in Food. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 756, 189–198.
- Illum, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical research*, 15, 1326–1331.
- Illum, L.; Jabbal-Gill, I.; Hinchcliffe, M.; Fisher, A. N.; Davis, S. S. (2001). Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Advanced drug delivery reviews*, 51, 81–96.

- Innojet Herbert Hüttlin (Hg.). Innojet Ventilus im Labormaßstab. *Produktbroschüre*.
- Jabbal-Gill, I.; Fisher, A. N.; Rappuoli, R.; Davis, S. S.; Illum, L. (1998). Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin and recombinant pertussis toxin after nasal administration with chitosan in mice. *Vaccine*, 16, 2039–2046.
- Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M. (2002). Immunologie. 5. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- Jones, N. (2001). The nose and paranasal sinuses physiology and anatomy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 51, 5–19.
- Kang, M. L.; Cho, C. S.; Yoo, H. S. (2009). Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. *Biotechnology Advances*, 27, 857–865.
- Kang, M. L.; Kang, S. G.; Jiang, H.-L.; Shin, S. W.; Lee, D. Y.; Ahn, J.-M.; Rayamahji, N.; Park, I.-K. et al. (2006). In vivo induction of mucosal immune responses by intranasal administration of chitosan microspheres containing Bordetella bronchiseptica DNT. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 63, 215–220.
- Keck, T.; Leiacker, R.; Riechelmann, H.; Rettinger, G. (2000). Temperature profile in the nasal cavity. *The Laryngoscope*, 110, 651–654.
- Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1751, 119–139.
- Kingsley, G. R. (1939). The determination of serum total protein, albumin, and globulin by the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 197–200.
- Koseki, T.; Kitabatake, N.; Doi, E. (1988). Conformational Changes in Ovalbumin at Acid pH. *Journal of Biochemistry*, 103, 425–430.
- Kublik, H. und Vidgren, M. T. (1998). Nasal delivery systems and their effect on deposition and absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 29, 157–177.
- Kuhli, M. (2009). Entwicklung von Aufgabesystemen zur Charakterisierung pharmazeutischer Aerosole mit einem optischen Partikelzähler. *Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*.
- Kundoor, V. und Dalby, R. (2011). Effect of Formulation- and Administration-Related Variables on Deposition Pattern of Nasal Spray Pumps Evaluated Using a Nasal Cast. *Pharmaceutical Research*, 28, 1895–1904.

- Kuper, F. C.; Koornstra, P. J.; Hameleers, D. M. H.; Biewenga, J.; Spit, B. J.; Duijvestijn, A. M.; van Breda Vriesman, P. J. C.; Sminia, T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunology Today*, 13, 219–224.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Li, X.; Inthavong, K.; Tu, J. (2012). Particle inhalation and deposition in a human nasal cavity from the external surrounding environment. International Workshop on Ventilation, Comfort, and Health in Transport Vehicles. *Building and Environment*, 47, 32–39.
- Lin, W.-H.; Griffin, D. E.; Rota, P. A.; Papania, M.; Cape, S. P.; Bennett, D.; Quinn, B.; Sievers, R. E. et al. (2011). Successful respiratory immunization with dry powder live-attenuated measles virus vaccine in rhesus macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 2987–2992.
- Lindblad, E. B. (2004a). Aluminium adjuvants - in retrospect and prospect. *Vaccine*, 22, 3658–3668.
- Lindblad, E. B. (2004b). Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunology and Cell Biology*, 82, 497–505.
- Lippmann, M.; Yeates, D. B.; Albert, R. E. (1980). Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *British Journal of Industrial Medicine*, 37, 337–362.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 265–275.
- Maa, Y. F.; Ameri, M.; Shu, C.; Payne, L. G.; Chen, D. (2004). Influenza vaccine powder formulation development: spray-freeze-drying and stability evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, 1912–1923.
- Malvern Instruments (2004). Zetasizer Nano Series User Manual. 2.1. Aufl.
- Marttin, E.; Schipper, N. G. M.; Verhoef, J. C.; Merkus, F. W. H. M. (1998). Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 29, 13–38.
- McReynolds, L.; O'Malley, B. W.; Nisbet, A. D.; Fothergill, J. E.; Givol, D.; Fields, S.; Robertson, M.; Brownlee, G. G. (1978). Sequence of chicken ovalbumin mRNA. *Nature*, 273, 723–728.
- MedImmune (2012). Prescribing information FluMist®. www.flumist.com, 09.11.2012

- Mellet, P.; Michels, B.; Bieth, J. G. (1996). Heat-induced Conversion of Ovalbumin into a Proteinase Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 30311–30314.
- Mestecky, J.; Moldoveanu, Z.; Michalek, S. M.; Morrow, C. D.; Compans, R. W.; Schafer, D. P.; Russell, M. W. (1997). Current options for vaccine delivery systems by mucosal routes. *Journal of Controlled Release*, 48, 243–257.
- Meyer, C.; Reiter, S.; Siedler, A.; Hellenbrand, W.; Rasch, G. (2002). Über die Bedeutung von Schutzimpfungen. Epidemiologie, Durchimpfungsraten, Programme. *Bundesgesundheitsblatt*, 45, 323–331.
- Monteiro-Riviere, N. A. und Popp, J. A. (1984). Ultrastructural characterization of the nasal respiratory epithelium in the rat. *American Journal of Anatomy*, 169, 31–43.
- Morein, B.; Sundquist, B.; Hoglund, S.; Dalsgaard, K.; Osterhaus, A. (1984). Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*, 308, 457–460.
- Morita, T. und Yamahara, H. Peptides and Proteins: Nasal Absorption. In: Swarbrick, J. (Hg.): *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Bd. 4, Informa Healthcare USA, Inc., New York, 2678–2691.
- Murayama, K. und Tomida, M. (2004). Heat-Induced Secondary Structure and Conformation Change of Bovine Serum Albumin Investigated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry*, 43, 11526–11532.
- Mygind, N. und Änggård, A. (1984). Anatomy and physiology of the nose - pathophysiologic alterations in allergic rhinitis. *Clinical Reviews in Allergy*, 2, 173–188.
- Mygind, N. und Dahl, R. (1998). Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 29, 3–12.
- Neutra, M. R.; Frey, A.; Kraehenbuhl, J.-P. (1996). Epithelial M Cells: Gateways for Mucosal Infection and Immunization. *Cell*, 86, 345–348.
- Neutra, M. R. und Kozlowski, P. A. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature Reviews. Immunology*, 6, 148–158.
- Neutra, M. R.; Pringault, E.; Kraehenbuhl, J.-P. (1996). Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annual Review Immunology*, 275–300.
- Partidos, C. D. (2000). Intranasal vaccines: forthcoming challenges. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3, 273–281.

- Pearse, M. J. und Drane, D. (2005). ISCOMATRIX® adjuvant for antigen delivery. Trends in particulate antigen and DNA delivery systems for vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 465–474.
- Pérez, C.; Castellanos, I. J.; Costantino, H. R.; Al-Azzam, W.; Griebenow, K. (2002). Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54, 301–313.
- Perry, M. und Whyte, A. (1998). Immunology of the tonsils. *Immunology Today*, 19, 414–421.
- Ph. Eur. (2012). Pufferlösungen 4.1.3. *Europäisches Arzneibuch 7.0*, amtliche deutsche Ausgabe.
- Pinto Reis, C.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2, 8–21.
- Quintanar-Guerrero, D.; Allemann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. (1998). Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24, 1113–1128.
- RCSB Protein Data Bank, Bovine Serum Albumin, www.rcsb.org/pdb
- Ren, D.; Yi, H.; Wang, W.; Ma, X. (2005). The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Research*, 340, 2403–2410.
- Riedel, S. (2005). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 18, 21–25.
- Robert Koch Institut. Impfen.
<http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/impfen.html>.
- Rothschild, M. A.; Oratz, M.; Schreiber, S. S. (1988). Serum albumin. *Hepatology Baltimore*, 8, 385–401.
- Rücker, G.; Neugebauer, M.; Willems, G. (2001). Instrumentelle pharmazeutische Analytik. Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden. 3. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Scherließ, R. (2011). In vitro particle deposition in the nasal cavity. *Inhalation*, 5, 14–18.

- Schoel, B.; Welzel, M.; Kaufmann, S. H. E. (1995). Quantification of protein in dilute and complex samples: modification of the bicinchoninic acid assay. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 30, 199–206.
- Schoenbrodt, T.; Egen, M.; Heyder, K.; Kohler, D.; Kranz, Y.; Mueller, C.; Schiewe, J. (2010). Method development for deposition studies in a nasal cast. *Respiratory Drug Delivery Orlando*, 445–449.
- Sharma, S.; Mukkur, T. K.; Benson, H. A.; Chen, Y. (2008). Pharmaceutical aspects of intranasal delivery of vaccines using particulate systems. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98, 812–843.
- Sharma, S.; Mukkur, T. K.; Benson, H. A.; Chen, Y. (2012). Enhanced immune response against pertussis toxoid by IgA-loaded chitosan-dextran sulfate nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, 233–244.
- Shephard, M. J.; Todd, D.; Adair, B. M.; Po, A. L. W.; Mackie, D. P.; Scott, E. M. (2003). Immunogenicity of bovine parainfluenza type 3 virus proteins encapsulated in nanoparticle vaccines, following intranasal administration to mice. *Research in Veterinary Science*, 74, 187–190.
- Shinohara, H.; Iwasaki, T.; Miyazaki, Y.; Matsuo, K.; Aoki, T.; Matsumoto, M.; Oka, T.; Kurisaki, J.-i. et al. (2005). Thermostabilized ovalbumin that occurs naturally during development accumulates in embryonic tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1723, 106–113.
- Silverman, G. A. (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions and a revised nomenclature. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 33293–33296.
- Singh, M. und O'Hagan, D. (2002). Recent Advances in Vaccine Adjuvants. *Pharmaceutical Research*, 19, 715–728.
- Slütter, B.; Hagenaars, N.; Jiskoot, W. (2008). Rational design of nasal vaccines. *Journal of drug targeting*, 16, 1–17.
- Smith, M. B. und F Back, J. (1965). Studies on Ovalbumin II. The formation and properties of S-Ovalbumin, a more stable form of Ovalbumin. *Australian Journal of Biological Sciences*, 18, 365–377.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M. et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76–85.
- Steckel, H. (2007). Excipients. In: Bechtold-Peters, K. und Luessen, H. (Hg.) *Pulmonary Drug Delivery. Basics, Applications and Opportunities for Small Molecules and Biopharmaceutics*. apv pharma reflexions, Esitio Cantor Verlag, Aulendorf.

- Steckel, H. und Bolzen, N. (2004). Alternative sugars as potential carriers for dry powder inhalations. *International Journal of Pharmaceutics*, 270, 297–306.
- Swift, D. (1991). Inspiratory Inertial Deposition of Aerosols in Human Nasal Airway Replicate Casts: Implication for the Proposed NCRP Lung Model. *Radiation Protection Dosimetry*, 38, 29–34.
- Sympatec GmbH (2011). HELOS & Co. *PM-Tour Begleitunterlagen*.
- Takeda, K.; Wada, A.; Yamamoto, K.; Moriyama, Y.; Aoki, K. (1989). Conformational change of bovine serum albumin by heat treatment. *Journal of Protein Chemistry*, 8, 653–659.
- Telko, M. J. und Hickey, A. J. (2005). Dry powder inhaler formulation. *Respiratory care*, 50, 1209–1227.
- Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P. (1999). Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 5. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- USP (2011). Physical Tests/Nasal Sprays. In: *United States Pharmacopoeia* 34, Bd. 1, 220.
- van der Lubben, I. M.; Kersten, G.; Fretz, M. M.; Beuvery, C.; Coos Verhoef, J.; Junginger, H. E. (2003). Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. *Vaccine*, 21, 1400–1408.
- van der Lubben, I. M.; Verhoef, J. C.; Borchard, G.; Junginger, H. E. (2001). Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14, 201–207.
- Varshosaz, J.; Sadrai, H.; Alinagari, R. (2004). Nasal delivery of insulin using chitosan microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 21, 761–774.
- Vehring, R. (2008). Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying. *Pharmaceutical Research*, 25, 999–1022.
- Verdugo, P. (1991). Mucin Exocytosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 144, S33–S37.
- Vila, A.; Sánchez, A.; Janes, K.; Behrens, I.; Kissel, T.; Jato, J. L. V.; Alonso, M. J. (2004). Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 123–131.
- Vila, A.; Sánchez, A.; Tobío, M.; Calvo, P.; Alonso, M. J. (2002). Design of biodegradable particles for protein delivery. *Journal of Controlled Release*, 78, 15–24.

- Vollmar, A. und Dingermann, T. (2005). Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Wang, N. und Wu, X. S. (1997). Preparation and characterization of agarose hydrogel nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Pharmaceutical development and technology*, 2, 135–142.
- Wanner, A.; Salathé, M.; O'Riordan, T. G. (1996). Mucociliary clearance in the airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 154, 1868–1902.
- Washington, N.; Steele, R. J. C.; Jackson, S. J.; Bush, D.; Mason, J.; Gill, D. A.; Pitt, K.; Rawlins, D. A. (2000). Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers. *International Journal of Pharmaceutics*, 198, 139–146.
- WHO (2010). Scientific review of variola virus research, 1999-2010.
- Wilson-Welder, J. H.; Torres, M. P.; Kipper, M. J.; Mallapragada, S. K.; Wannemuehler, M. J.; Narasimhan, B. (2009). Vaccine adjuvants: Current challenges and future approaches. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 1278–1316.
- Xiang, S. D.; Scholzen, A.; Minigo, G.; David, C.; Apostolopoulos, V.; Mottram, P. L.; Plebanski, M. (2006). Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? Particle-based Vaccines. *Methods*, 40, 1–9.
- Zündorf, I.; Vollmar, A. M.; Dingermann, T. (2008). Immunologische Grundlagen des Impfens. Hightech-Training für das Immunsystem. *Pharmazie in unserer Zeit*, 37, 20–27.

Danksagung

An dieser Stelle sei allen gedankt, die mich während meiner Promotionszeit begleitet und unterstützt haben und ohne die die vergangenen Jahre nicht so lehrreich, spannend und unterhaltsam gewesen wären.

Zunächst möchte ich mich herzlich bei gleich zwei Betreuern für Ihre Unterstützung bei der Bearbeitung dieses interessanten und aktuellen Themas und die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis bedanken: bei Herrn Prof. Dr. Hartwig Steckel, meinem Doktorvater, sowie bei Frau Dr. Regina Scherließ. Sie gaben mir die Möglichkeit, dieses Thema weitgehend selbstständig zu bearbeiten und standen mir beide dennoch jederzeit für konstruktive Diskussionen zur Verfügung.

Ein weiterer Dank geht an RPC Formatec und Aptar für die Zurverfügungstellung der Applikationshilfen sowie an Boehringer Ingelheim für die Bereitstellung des Nasenmodells.

Des Weiteren danke ich auch der Firma InnoJet/Herbert Hüttlin für die freundliche Kooperation und die Durchführung des Coating-Versuchs.

Den Kolleginnen und Kollegen möchte ich herzlich für die schöne Zeit in freundlicher Arbeitsatmosphäre sowie die vielfältige Unterstützung danken. Ein Extra-Dankeschön geht an dieser Stelle an Lars, Gereon und Sven für die zeitraubende Anfertigung von REM-Aufnahmen sowie an alle Praktikumsassistenten, besonders aber an Simon, Katha, Janine und Ronja für die tolle Zusammenarbeit bei der Betreuung der Studentenpraktika.

Für ihre Hilfsbereitschaft möchte ich mich auch bei unseren TA's bedanken, vor allem bei Maren für ihre Unterstützung bei der Durchführung der

Gelelektrophoresen sowie bei Anna für ihre Hilfe in der Klimakammer. Ansonsten hätte so mancher Tag wohl mehr als 24 Stunden haben müssen.

Ein großes Dankeschön geht auch an Herrn Rüdiger Smal. Zum einen für die vielen unterhaltsamen und aufmunternden Gespräche, zum anderen für die Anfertigung der tollen Zeichnungen, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Katha, Simon, Regina und Kirsten danke ich für das aufmerksame Korrekturlesen dieser Arbeit. Vielen Dank für die investierte Zeit und Mühe sowie die konstruktive Kritik und das Aufspüren von Formatierungsfehlern.

Darüber hinaus möchte ich mich insbesondere bei Katha, Ronja, Kirsten, Gereon und Eike nicht nur für die tolle Zusammenarbeit am Institut, sondern auch für die zahlreichen schönen, lustigen und erholsamen Stunden und Tage jenseits der Forschungsarbeit bedanken. Ohne euch wäre die Zeit in Kiel nur halb so schön gewesen. Vielen Dank natürlich auch an Simon für die zahlreichen ideengebenden, aufbauenden und unterhaltsamen Gespräche und den tollen Zusammenhalt in unserem „kleinen Arbeitskreis“.

Von ganzem Herzen möchte ich auch Carsten danken. Besonders in der nervenaufreibenden Phase des Zusammenschreibens war er immer für mich da und hat mir Mut zugesprochen, auch wenn das nicht immer leicht war.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern für ihre stetige, liebevolle Unterstützung und ihr aufrichtiges Interesse an meiner Arbeit bedanken. Ohne sie wäre ich niemals so weit gekommen.

Danke!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sabrina Trows
Geburtsdatum	07. Januar 1983
Geburtsort	Buchholz i.d.N.
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1989-1993	Grundschule Tostedt
1993-1995	Orientierungsstufe Tostedt
1995-2003	Gymnasium Tostedt
1999-2000	Socastee High School, Myrtle Beach, South Carolina, USA
2003	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

10/2003 – 11/2007	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/2005	1. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
11/2007	2. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung

Praktische Ausbildung

12/2007 – 05/2008	Schiller Apotheke, Hamburg
07/2008 – 12/2008	Universität Helsinki, Finnland
03/2009	3. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

seit 04/2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. H. Steckel
--------------	---

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 8 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden und wurde bisher bei keiner anderen Universität zur Begutachtung eingereicht.

Sabrina Trows